ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. X No 2

1 9 6 1

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm, należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja *„Acta Microbiologica Polonica"*. Wrocław, skrytka pocztowa nr 73.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) muszą być uprzednio akceptowane przez tłumacza Redakcji; należy do nich dołączyć wersję polską i streszczenie w języku polskim. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku polskim oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora (ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora (ów), kropka, rok, dwukropek, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora (ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie, 75 odbitek nie zszywanych — po cenie zryczałtowanej (około 2 zł za stronę druku).

* * *

Zgodnie z poleceniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, w przyszłości prace oryginalne będą publikowane w języku angielskim lub francuskim.

Zmiana ta będzie stopniowo wprowadzana w życie już w 1961 r.

W związku z powyższym objętość prac zostanie ograniczona do maksimum 1 arkusza wydawniczego. Prace mogą być nadsyłane w wersji polskiej z załączonym słownikiem stosowanych terminów fachowych w języku publikacji. Tłumaczenie w takim przypadku wykona Redakcja na koszt autora. Prace przygotowane w wersji obcej muszą uprzednio uzyskać akceptację jednego z tłumaczów Redakcji. Do wersji obcej należy dołączyć 1 egzemplarz w wersji polskiej.

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. X No 2

1961

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek rzeczywisty PAN — Lublin, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Warszawa, Eugeniusz Pijanowski, członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź i S. Bujak, Lublin

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
ODDZIAŁ WROCŁAWSKI

Nakład 1077+143 egz.	Oddano do składania 1. IV. 1961 r.
Ark. wyd. 7,5 ark. druk. 6^3/$_8$	Podpisano do druku 26. VI. 1961 r.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g.	Druk ukończono w czerwcu 1961 r.
Cena zł. 25,–	Nr zam. 109/61. T-6

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 123—127

BRONISŁAW NIKLEWSKI (1879—1961) JAKO MIKROBIOLOG

W dniu 20 stycznia 1961 r. zmarł w Poznaniu w wieku lat 81 Bronisław Niklewski, profesor fizjologii roślin Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu, uprzednio wieloletni Kierownik Katedry Fizjologii Roślin i Chemii Rolnej.

Zmarły był przede wszystkim fizjologiem. Jego wielki dorobek w tej dziedzinie zostanie na pewno omówiony w czasopismach botanicznych i rolniczych. W pierwszym okresie swojej działalności naukowej Bronisław Niklewski interesował się jednak również mikrobiologią.

Owocem tych zainteresowań, obudzonych jeszcze w czasie pobytu Niklewskiego w zakładzie Pfeffera w Lipsku, było stosunkowo niewiele opublikowanych prac. Znaczenie tych prac dla rozwoju mikrobiologii ogólnej jest jednak tak duże, że zasługują na odrębne omówienie.

Dociekania Niklewskiego skoncentrowały się na dwóch tylko problemach: nitryfikacji w glebie i w oborniku oraz fizjologii bakterii wodorowych.

W owym czasie (1905-1910 r.) rozpowszechniony był pogląd, opierający się na złym zrozumieniu pracy Winogradskiego i Omeliańskiego (1899, *Arch, Sci. Biol.*, 7) o wpływie substancji organicznych na nitryfikację w czystych kulturach nitryfikatorów. Wielu bowiem badaczy na tej podstawie starało się wykazać, że nitryfikacja nie może przebiegać w nawozach lub glebach nawożonych.

Niklewski (Karpiński i Niklewski 1907, Niklewski 1910) w starannie wykonanych eksperymentach wykazał, że w kulturach mieszanych dodatek małych ilości substancji organicznej (humiany, cukry) stymuluje nitryfikację. Stwierdził też, że w oborniku, zwłaszcza w gnojowniach, już po półtoratygodniowym składowaniu rozpoczyna się intensywna nitryfikacja, wywołana przez drobnoustroje opisane przez Winogradskiego. Drogą wielokrotnej selekcji otrzymał szczepy nitryfikatorów, znoszące nawet 2,8-procentowe stężenie amoniaku. Silnie hamuje nitryfikację natomiast mocz i bogata weń gnojówka.

Przyczyną uwalniania z obornika azotu cząsteczkowego są, jak to pierwszy wykazał Niklewski, wyłącznie bakterie denitryfikujące, współżyjące z nitryfikatorami. Obecność tych ostatnich jest jednak dla rozpoczęcia procesu denitryfikacji konieczna, gdyż one jedynie dostarczają azotanów — jako substratu denitryfikacji.

Badania te — dziś mające znaczenie raczej tylko historyczne — wówczas obok podobnych prac Bazarewskiego (1906, Beitrag zur Kenntniss der Nitrifikation, Dysertacja, Göttingen), Colemana (1908, *Centr. Bakt.* II, **20**: 401) — nie tylko stanowiły poważny krok na drodze zrozumienia przebiegu procesów mikrobiologicznych w glebach i nawozach organicznych, ale dawały również rolnictwu praktyczne wskazówki.

Bardziej doniosłą rolę w historii mikrobiologii odegrały prace Niklewskiego (1906, 1908, 1910, 1913) nad utlenianiem wodoru cząsteczkowego i odkrycie przezeń bakterii wodorowych (*Hydrogenomonas*).

Wykrycie biologicznej aktywacji wodoru i utleniania go przez tlen cząsteczkowy zawdzięczamy trzem badaczom, których doniesienia ukazały się niemal jednocześnie: Kaserera (1905, *Zeitschr. Land. Versuchs. Össterreich,* 8: 789; 1906, *Centr. Bakt. II,* **16**: 681), Niklewskiego (1906, 1907) i Lebedeffa (1906, Nabokich i Lebedeff, *Centr. Bakt. II,* **17**: 350; 1907, Lebedeff, *Biochem. Zeitschr.,* **7**: 1).

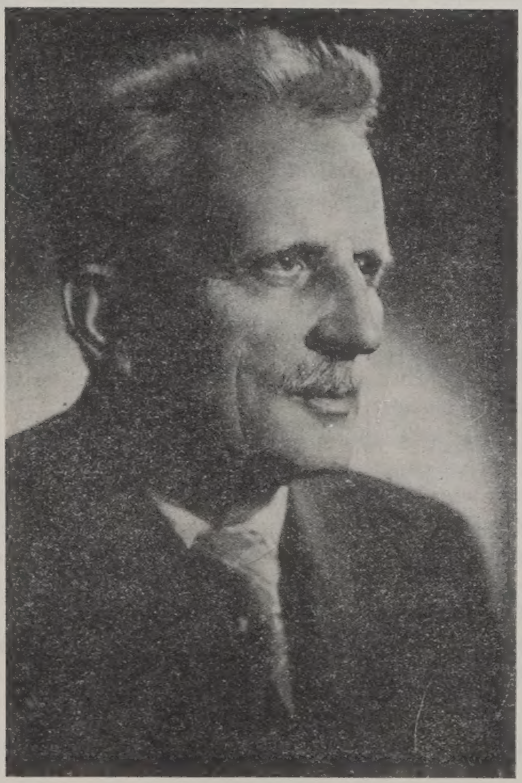
Właściwości bakterii utleniających wodór zostały jednak najdokładniej podane przez Niklewskiego w serii prac ogłaszanych w latach 1906-1913 (1906, 1908, 1910, 1913).

Bakterie te, nazwane w 1909 r. przez Orla Jensena (*Centr. Bakt. II,* **22**: 305) *Hydrogenomonas,* zostały w czystych hodowlach po raz pierwszy izolowane właśnie przez Niklewskiego (1910, 1913).

Uderzające jest, jak mało dodały późniejsze badania nad *Hydrogenomonas* do zasobu wiadomości, zebranych przez Niklewskiego. Wyróżnił on *H. flava* (przemianowany potem przez Kluyvera na *H. flavus), H. vitrea, H. agilis* i *H. minor,* dając dokładny opis ich morfo- i fizjologii.

Słusznie, jak dziś wiemy, zakwestionował wnioski Kaserera (1906), wykazując, że ten ostatni pracował nad mieszaniną bakterii, a nie nad czystą kulturą. W licznych eksperymentach stwierdził, że *Hydrogenomonas* jest względnym autotrofem, zdolnym do asymilacji dwutlenku węgla kosztem energii uwalnianej w procesie utleniania wodoru cząsteczkowego. Bakterie te są jednak zdolne do odżywiania heterotroficznego, wyzyskując wiele związków organicznych. Najsilniej stosunkowo właściwości heterotroficzne są rozwinięte u *H. vitrea.*

Wzorując się na eksperymentach Godlewskiego sen., zbadał ilościowo pochłanianie gazów w hodowli *Hydrogenomonas,* udowadniając bezspornie jego zdolność do wiązania CO_2. Wyjaśnił też źródło trudności otrzymywania czystych kultur bakterii wodorowych — znajdując, że drobno-



Profesor dr Bronisław Niklewski

ustroje te, chociaż są typowymi tlenowcami, odznaczają się dużą wrażliwością na nadmiar tlenu w środowisku. Większość szczepów wymaga obniżenia stężenia tlenu do kilku procent objętości, tylko wykryty później *H. agilis* jest bardziej pod tym względem tolerancyjny.

Niklewski wykazał dalej, że *H. agilis* może utleniać wodór beztlenowo, ale jedynie w obecności azotanów, które denitryfikuje jednocześnie na N_2 — wyjaśniając tym samym pobieżne obserwacje Lebedeffa (1906, 1907).

Wreszcie Niklewskiemu zawdzięczamy opis *H. minor* — bakterii zdolnej do utleniania wodoru w nieobecności tlenu, jeśli w podłożu znajdują się siarczany. Te ostatnie ulegają przy tym redukcji do siarkowodoru. *H. minor* zdolna była w tych warunkach do rozwoju na pożywce mineralnej, a więc odżywiania autotroficznego. Autotrofizm bakterii wodorowych redukujących siarczany został ponownie wykryty dopiero przez Butlina i Adamsa w r. 1947 (*Nature,* **160**: 154). Wydaje się też prawdopodobne, że *H. minor* był identyczny ze *Spirillum (Bacillus) desulfuricans* Beijerinck (*Centr. Bakt. II,* 1895, **1**: 1 i 1900, **6**: 648) określonym jako *Desulfovibrio desulfuricans* przez Kluyvera i Van Niela (*Arch. Mikrobiol.,* 1938, **9**: 300). W każdym bądź razie do Niklewskiego należy priorytet wykrycia autotrofizmu bakterii wodorowych tlenowych i beztlenowych.

Od I wojny światowej Niklewski zarzucił prawie zupełnie badania mikrobiologiczne, poświęcając się w pełni fizjologii roślin. Ostatnia Jego praca nad zmiennością bakterii, niemal ukończona w chwili wybuchu I wojny światowej, uległa zniszczeniu w czasie okupacji niemieckiej.

Wśród uczniów Bronisława Niklewskiego tylko jeden poświęcił się mikrobiologii — był to przedwcześnie zmarły prof. dr J. Duda (patrz *Acta Microbiol. Polon.,* 1960, **9**: 3.).

Swoimi pracami nad bakteriami wodorowymi Niklewski zasłużył sobie na poczesne miejsce w historii mikrobiologii.

BIBLIOGRAFIA PRAC BRONISŁAWA NIKLEWSKIEGO O TEMATYCE MIKROBIOLOGICZNEJ

BIBLIOGRAPHY OF THE RESEARCH PAPERS OF BRONISŁAW NIKLEWSKI DEVOTED TO MICROBIOLOGY

1906 Ein Beitrag zur Kenntniss wasserstoffoxydierenden Mikroorganismen. *Bull. de l'Acad. Sci. Cracoviae, Cl. Sci. math. nat.*: 911.

1907 (wspólnie z Karpińskim): Über den Einfluss organischer Verbindungen auf den Verlauf der Nitrifikation in unreinen Kulturen. *Bull. de l'Acad. Sci. Cracovie, Cl. Sci. math. nat.*: 596.

1908 Ein Beitrag zur Kenntniss wasserstoffoxydierenden Mikroorganismen. *Bull. de l'Acad. Sci. Cracovie, Cl. sci. math. nat.* BCII, **20**: 496.

Ein Beitrag zur Kenntniss wasserstoffoxydierenden Mikroorganismen. II. *Centr. Bakt. II*, **20**: 469.

1910 Über die Wasserstoffoxydation durch Mikroorganismen. *Jahrb. Wissenschaftl. Botan.*, **48**: 113.

Über die Bedingungen der Nitrifikation im Stallmist. *Centr. Bakt. II*, **26**: 388.

1913 Über die Wasserstoffaktivierung durch Bakterien unter besonderer Berücksichtigung der neuen Gattung *Hydrogenomonas agilis*.

Jubiläumschrift für Prof. Dr E. Godlewski sen. *Kosmos* oraz *Centr. Bakt. II*, 1914, **40**: 430.

BRONISŁAW NIKLEWSKI
(1879—1961)

Bronisław Niklewski was born September 8, 1879, in Inowrocław. He received his Ph. D. degree from Leipzig University. Until his retirement in 1960 he was Professor of Plant Physiology at the School of Agriculture, Poznań.

Although his main scientific interest was in plant physiology, his papers on hydrogen oxidation and hydrogen bacteria as well on nitrification in soil and dung were generally known. He was the first to show, in controlled experiments, that hydrogen bacteria are facultative autotrophs. It is to him that we owe the first documentated description of sulphate-reducing anaerobic autotrophic hydrogen bacteria.

Professor Dr B. Niklewski passed away January 20, 1961 at his home in Poznań.

Władysław Kunicki-Goldfinger

Zakład Mikrobiologii
Uniwersytetu Warszawskiego
w Warszawie

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 129—133

Władysław J. H. Kunicki-Goldfinger *

ADAPTIVE ENZYMES IN THE PATHWAY OF TRYPTOPHANE SYNTHESIS IN *ESCHERICHIA COLI*

(Preliminary note)

From the Department of Microbiology, The University, Wrocław
Received: December 28, 1960

Since the publication of Karström's paper (*Ergebn. Enzymforsch.*, 1938, 7: 350) considerable work on enzymic adaptation has been published. Previous studies, however are limited to adaptive enzymes in catabolic processes.

According to many authors the enzymes acting upon intermediate metabolites are always present. It would be then difficult if not impossible to know whether their production is dependent upon their substrates acting as inducers. On the other hand there is the well known phenomenon of negative feedback inhibition of synthesis of enzymes. It seems then not improbable that induction may be involved also in the synthesis of enzymes, operating in anabolic processes.

This report presents some results of exploratory studies in which the growth pattern of bacteria was used to asses the inducible nature of enzymes, concerned in tryptophane synthesis.

MATERIAL AND METHODS

Escherichia coli K-12 prototrophic strain, harvested during the exponential phase of growth in the broth cultures was used. Aliquots of cells were then centrifuged, washed, resuspended and placed in nitrogen deficient medium (glucose — 1 g, KH_2PO_4 — 2 g, K_2HPO_4 — 7 g, sodium citrate — 0,5 g, $MgSO_4$ — 0, 1 g, distilled water — to 1000 ml), and incubated at 37°C for 2 hours. At the end of nitrogen starvation, the cells were spread on the surface of 2-per cent agar media.

* The author wishes to acknowledge the technical assistance of Mrs Ewa Zarzeczna, M. Sci.

Following media were used: a) minimal (Lederberg J., 1950 in „Methods in Medical Research" vol. 3) referred later as the *M*-medium; b) *M*-medium + adenine, guanine, thymine, lysine, arginine, methionine, leucine, iso-leucine, valine, phenylalanine, tyrosine, histidine, glutamic acid, proline, asparagine, alanine, glycine, serine, cysteine — à 10 mg/l; threonine — 20 mg/l, thiamine — 0,001 mg/l, riboflavine — 0,5 mg/l; PABA, nicotinic acid, Ca-pantothenate, pyridoxine — à 0.1 mg/l; choline — 2 g/l; biotine — 0,0001 mg/l. This medium will be referred as the F-medium; c) *F*-medium + 10 mg/l of anthranilic acid (referred as *A*-medium); d) *F*-medium + 10 mg/l of indole (referred as *I*-medium); e) *F*-medium + 10 mg/l of tryptophane (referred as *Tr*-medium).

The plates were incubated at 37°C for appropriate times.

Growth was measured microscopically. At 30-minutes intervals during growth the agar discs were cut and picked from incubated plates and than fixed in formalin vapour. Per cent division and average number of cells per bacterial group were determined by direct microscopic examination. All measurements were made in triplicates.

RESULTS AND DISCUSSION

The lag phase of growth varied, according to the kind of metabolite added (Table I).

Table I

Effect of tryptophane, and some intermediate metabolites in its synthesis, on the lag preceeding cell division

Medium	Intermediate added	Lag (in minutes)	
		observed	calculated
M	—	232	236
F	—	100	114
A	anthranilic acid	100	109
I	indole	90	92
Tr	tryptophane	40	70

Fig. 1—5 are illustrative growth diagrams showing that the pattern of cell division varies in accord with the place of the intermediate metabolites in the tryptophane synthesis pathway.

On the *Tr*-medium the first microscopic evidence of division occured at about 30 minutes of incubation. Division proceeded at a rather rapid rate after initiation, and more then 90 per cent of the cells have divided within 40 minutes after the first sign of division.

The curves of division rates for the media *I*, *A* and *F* were quite different.

The data presented in Table II show that the rate of first cell division varies in full accord with the expected pattern, based on the presumption of adaptability of examined enzyme complex.

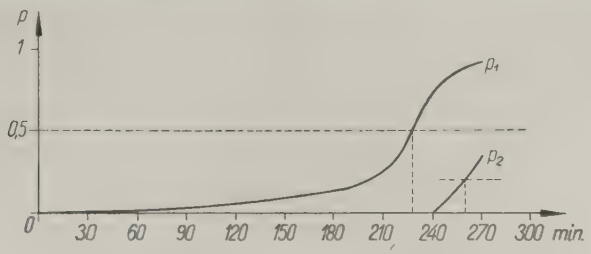


Fig. 1 — Minimal medium (*M*-medium)

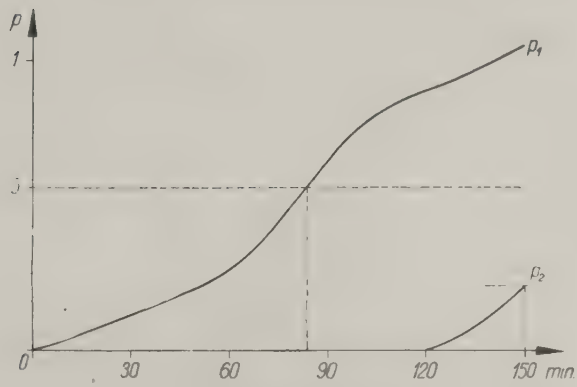


Fig. 2 — *F*-medium (all metabolites except tryptophane and its precursors)

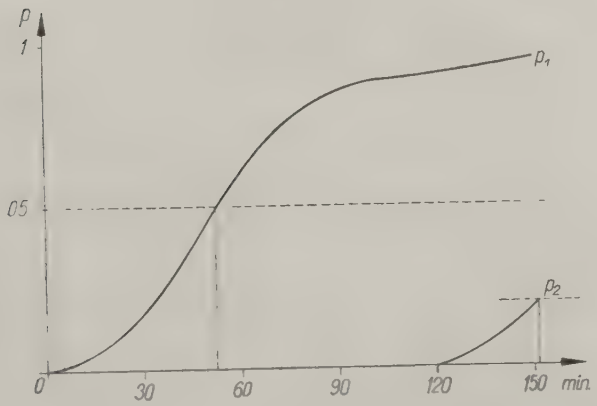


Fig. 3 — *A*-medium (all metabolites and athranilic acid)

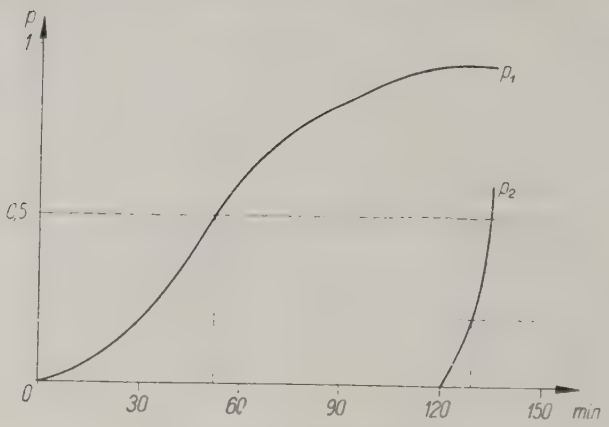


Fig. 4 — *I*-medium (all metabolites and indole)

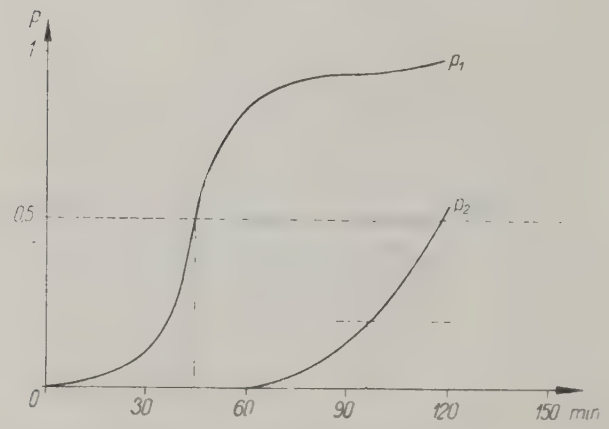


Fig. 5 — *Tr*-medium (all metabolites and tryptophane)
Fig. 1—5. Effect of medium constituents on the rate of the first and second cell divisions.

P_1 — the probability of the first cell division
P_2 — the probability of the second cell division

The available data seem to be consistent with the hypothesis that intermediates in tryptophane synthesis are operating as specific enzyme inducers. Of course without further study we cannot conclude that observed increase of the first division rate is determined solely by the enzymic adaptation during the given step of synthesis. Certainly the permeability mechanism should be taken into consideration, too.

Were the changes in the rates of first cell-division determined chiefly by the permeability differencies for examined intermediates — one should expect to find the same sequence during the second cell-division, when cells are allready operating under conditions of steady state. That this is not the case show the data in Table II, illustrating the time elapsing between the first sign of the 2-d division and the moment when 20 per cent of cells completed the 2-d division.

Table II

Relationship between the rates of cell division and the kind of metabolites added to the culture medium

Medium	Medium constituents	The rate of * the lst cell division 0,2—0,9 P_1 in minutes	The rate of** the 2nd cell division 0—0,2 P_2 in minutes
F	minimal + aminoacids and growth factors, except tryptophane and its precursors	118 *	30 **
A	*F* + anthranilic acid	78	32
I	*F* + indole	78	8
Tr	*F* + tryptophane	30	27

Explanation:

* The rate is measured by the number of minutes during which the probability of the first division increases from 0,2 to 0,9.

** The rate is measured in number of minutes during which the probability of the second division increases from 0 to 0,2.

The two rates are then uncomparable.

The sequence of the division rates is now quite different from the one, observed in the early phases of growth, when readjustment of the entire system was probably fully realized.

It appears that a close correlation may therefore be suggested between the rate of the first division and the number of inducible enzymic steps.

Further study is necessary before any final conclusion may be reached. Nevertheless the application of above described method in studies of enzyme adaptation may be an useful one.

Author's address:

Prof. Dr Wł. Kunicki-Goldfinger
Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski,
Warszawa, Krakowskie Przedmieście 26/28.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 135—140

Marian Hierowski i *Zdzisław Stolzmann*

WPŁYW CHLORAMFENIKOLU NA AKTYWACJĘ AMINOKWASÓW U *ESCHERICHIA COLI K-12a*

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Poznaniu
Wpłynęło dnia 3 listopada 1960 r.

Streszczenie

Badano wpływ chloramfenikolu na aktywację aminokwasów u *Escherichia coli K-12a.*

Stwierdzono, że chloramfenikol nie hamuje aktywacji aminokwasów, ani ich przenoszenia przez *„sRNA"* na rybosomy.

Chloramfenikol jest bardzo przydatnym związkiem w badaniach współzależności między syntezą białek i kwasów nukleinowych. Antybiotyk ten ma własność hamowania w pewnych układach syntezy białka przy nieznacznym wpływie na syntezę kwasów nukleinowych (Hahn i współpracownicy, 1957). W innych układach hamuje zarówno syntezę białka jak i kwasów nukleinowych (Breitman i Webster, 1958). Dzięki tym pracom wykazano, że aminokwasy odgrywają dużą rolę w syntezie kwasów nukleinowych (Gros i Gros, 1958, Neidhard Gros i Berg, 1957). Neidhard i współpracownicy wykazali, że w obecności chloramfenikolu kwas rybonukleinowy narasta gwałtownie, lecz po usunięciu ilość jego zmniejsza się. Po ponownym dodaniu antybiotyku zdepolimeryzowane fragmenty są ponownie repolimeryzowane na kwas rybonukleinowy. Kwas ten jednak różni się składem od zasadniczego kwasu rybonukleinowego bakteryjnego (Horowitz, Lombard i Chargaff, 1958) oraz posiada inne własności fizjologiczne (Neidhard i współpracownicy 1957, Pardee i współpracownicy, 1957). Gros i Gros (1958) wykazali na pewnych szczepach *E. coli*, wymagających niektórych aminokwasów, że synteza *DNA* występuje tylko wtedy, gdy chloramfenikol jest dodany do badanej próby po aminokwasie. Draculić i Errera (1959) stwierdzili, że po usunięciu chloramfenikolu

z układu synteza *DNA* przebiega dalej. Nasilona synteza *RNA* jak i zwolniona synteza *DNA* u *E. coli K-12a,* pozostającej pod wpływem chloramfenikolu, jest w ścisłym związku z zahamowaną syntezą białka. Mimo licznych prac nad hamującym wpływem chloramfenikolu na syntezę białka, metaboliczny punkt zaczepu nie jest całkowicie znany.

Dokładne badania wielu badaczy ustaliły, że jedna z dróg biosyntezy białka prawie we wszystkich żywych organizmach przebiega wg następującego schematu (de Moss i Novelli 1955, 1956, Hoagland 1955, Nisman i współpracownicy 1957; Symposium on amino acid activation, 1958):

I stopień: aktywacja aminokwasów, którą można przedstawić wg schematu:

$$AA + ATP + E \rightleftarrows E \,.\, AMP—AA + PP$$

II stopień: przeniesienie zaktywowanego aminokwasu do niskocząsteczkowego *RNA* tzw. „soluble *RNA*". Schematycznie ten stopień biosyntezy można wyrazić przy pomocy reakcji:

$$E \,.\, AMP — AA + sRNA \rightleftarrows AA — sRNA + AMP + E$$

III stopień: inkorporacja tych zaktywowanych aminokwasów do cząsteczek rybonukleoprotein tzw. ribosomów i kształtowanie się przestrzennej struktury nowopowstałego białka. *AA* — aminokwasy, *E* — enzymy aktywujące, *AMP* — kwas adenozynojednofosforowy, *ATP* — kwas adenozynotrójfosforowy, *PP* — pirofosforan.

Już de Moss i Novelli (1956) stwierdzili, że chloramfenikol nie hamuje aktywacji aminokwasów ani ich przeniesienia do rozpuszczalnego *RNA*. Ostatnio Nisman (1959), Lamborg i Zamecnik (1960) wykazali, że chloramfenikol hamuje inkorporację aminokwasów przez wyciągi z *E. coli.*

Dotychczas badania z chloramfenikolem przeprowadzono jednak nad mieszaniną aminokwasów, przy czym większość tych badań była prowadzona testem wymiany z radioaktywnym pirofosforanem.

BADANIA WŁASNE

Metody

E. coli K-12a hodowano na pożywce mineralnej wg Pardeego.

Acetonowe proszki. Po oddzieleniu bakterii od pożywki przez wirowanie w temperaturze 0° zalewano bakterie acetonem oziębionym do 30° i sączono przez sączek Büchnera. Osad przemywano oziębionym acetonem. Otrzymany proszek acetonowy suszono strumieniem zimnego powietrza aż do zaniku zapachu acetonu, po czym używano do dalszych badań.

Preparowanie enzymów aktywujących: 500 g proszku acetonowego homogenizowano z 10 ml 0,02 M Tris-buforu o *pH* 7,8 przez 10 minut i wirowano w 0° przez 30 minut przy 10 000 xg. Do górnej warstwy płynu dodawano nasycony siarczan amonu do 0,6 nasycenia, a następnie przy pomocy 0,2 N HCl ustalano *pH* roztworu na *pH* 5. Roztwór wirowano w 0° przez 5 minut przy 10 000 xg, a osad rozpuszczano w 0,2 M Tris-buforze o *pH* 7,8 do końcowej objętości 5 ml.

Zawartość białka w preparatach enzymatycznych oznaczano na fotometrze M. G. F. Havemanna metodą biuretową, podaną dokładniej przez Szafrańskiego i Sułkowskiego (1959).

Oznaczanie. Mieszanina inkubacyjna normalna zawierała w 1 ml: $MgCl_2$ 10 μmoli, 0,2 ml 0,2 M Tris-buforu o *pH* 7,8, l-aminokwasu 10 μmoli, Na_2ATP 11 μmoli, NH_2OH 1500 μmoli, pirofosfatazy 5 μg i 0,1 ml preparatu enzymu. Mieszanina inkubacyjna badana zawierała w 1 ml: $MgCl_2$ 10 μmoli, 0,2 ml 0,2 M Tris-buforu o *pH* 7,8, l-aminokwasu 10 μmoli, Na_2ATP 11 μmoli, NH_2OH 1500 μmoli, pirofosfatazy 5 μg, chloramfenikolu 20 μg i 0,1 ml preparatu enzymu.

Zawartość białka w enzymatycznych preparatach wahała się od 25 do 50 mg na 1 ml. Na_2ATP, l-aminokwasy i chloramfenikol rozpuszczano w 0,2 M Tris-buforze o *pH* 7,8. Krystaliczną pirofosfatazę Kunitza rozpuszczano w wodzie destylowanej. Używano także roztworu wodnego 6 N hydroksylaminy wolnej od soli.

Badano aktywację 14 aminokwasów: l-α-alaniny (Roche), l-argininy HCl (Nutritional Biochemicals Corporation), l-cysteiny HCl (Schuhardt), glicyny (Gliwice), l-histydyny (Nutritional Biochemicals Corporation), l-izoleucyny (Roche), kwasu dl-asparaginowego (Gliwice), kwasu l-glutaminowego HCl (Light), l-leucyny (Schuhardt), l-lizyny (Schuhardt), l-oksyproliny (Roche), l-proliny (Nutritional Biochemicals Corporation), l-tryptofanu (Roche), l-tyrozyny (Roche).

Kontrolną próbę z inaktywowanym enzymem przeprowadzono dla każdego aminokwasu. W próbie kontrolnej $MgCl_2$, Tris-bufor i badany l-aminokwas dodawano do enzymu przed jego inaktywacją. Inaktywowano enzym przez podgrzewanie w ciągu 2 minut we wrzącej wodzie. Badane próby następnie oziębiano w lodzie i dodawano pozostałe składniki w wyżej wymienionej kolejności. Próby inkubowano przez 30 minut przy 37°. Reakcję enzymatyczną przerywano przez dodanie 2,3 ml odczynnika Hoaglanda (CCl_3COOH 50,5 g, stężony HCl 25 ml, $FeCl_3$ 60,0 g i woda destylowana do 1 litra). Próby kolejno wytrząsano i wirowano dekantując następnie górną warstwę roztworu do kiuwet. Oznaczanie przeprowadzano na spektrofotometrze Unicam S. P. 500 przy długości fali 520 mμ. Ilości kwasów hydroksamowych badanych aminokwasów obliczano z krzywej wzorcowej zrobionej na kwasie hydroksamowym glicyny wg Safira i Williamsa. Dokładniejszy opis metody przytoczony jest w pracy Szafrańskiego i Sułkowskiego (1959). Względny błąd metody: 10%.

WYNIKI

Otrzymane wyniki zawarto w tabeli I. Poszczególne wartości liczbowe są średnią arytmetyczną z trzech pomiarów z tym samym preparatem enzymatycznym. Wartości oznaczone jako „ślady" są mniejsze od 0,01 μM kwasów hydroksamowych/1 godz/1 mg białka.

Z wartości liczbowych przedstawionych w obydwóch kolumnach pionowych tabeli I wynika, że nie ma zasadniczych różnic między aktywacją aminokwasów z chloramfenikolem i bez dodania chloramfenikolu. Nie-

znaczne różnice dla l-cysteinyHCl, kwasu dl-asparaginowego, kwasu l-glutaminowego HCl, l-tryptofanu i l-tyrozyny leżą w granicach błędu metody.

Tabela I

Wpływ chloramfenikolu na aktywację aminokwasów
Effect of chloramphenicol on the activation of amino-acids

Aminokwasy Amino-acids	Aktywność specyficzna w μM kwasów hydroksamowych/1 godz./1 mg białka Specific activity, μM of hydroxamic acids/1 h/1 mg of protein	
	bez dodania chloramfenikolu without chloramphenicol	z dodatkiem chloramfenikolu with chloramphenicol
l-α-alanina	0,010	0,010
l-argininy HCl	0,020	0,020
l-cysteiny HCl	0,020	0,015
Glicyna	0,015	0,015
l-histydyna	ślady	ślady
l-izoleucyna	ślady	ślady
Kwas dl-asparaginowy	0,320	0,300
Kwasu l-glutaminowego HCl	0,170	0,160
l-leucyna	0,010	0,010
l-lizyna	0	0
l-oksyprolina	ślady	ślady
l-prolina	ślady	0
l-tryptofan	0,030	0,025
l-tyrozyna	0,075	0,070

DYSKUSJA

Pierwszy i drugi stopień biosyntezy białka są ze sobą ściśle złączone w pierwszym rzędzie przez enzymy aktywujące, które kierują reakcją przenoszenia zaktywowanego aminokwasu przez „*sRNA*". Wraz z „*pH 5* enzymami" wytrąca się tzw. „*pH 5 RNA*", który jest częścią całkowitego „*sRNA*" bakteryjnego. Połączenie aminokwas-*sRNA* daje także reakcję z NH_2OH. Dzięki temu można wnioskować o działaniu chloramfenikolu i na drugi stopień biosyntezy białka.

Ponieważ badane próby inkubacyjne kontrolne i badane nie wykazywały różnic w aktywnościach specyficznych wnioskujemy, że chloramfenikol nie działa hamująco na początkowe dwa stopnie biosyntezy białka

Chloramfenikol nie hamuje aktywacji aminokwasów u *E. coli K-12a*. Pierwszy stopień biosyntezy białka jest więc wolny od hamującego działania chloramfenikolu.

Hamujący wpływ chloramfenikolu nie obejmuje także drugiego stopnia biosyntezy białka u *E. coli K-12a*, to jest przenoszenia zaktywowanych aminokwasów przez „*sRNA*" do rybosomów.

Autorzy pragną wyrazić podziękowanie Prof. drowi H. Meiselowi za otrzymany szczep *E. coli K-12a*.

LITERATURA

Breitman T. R., Webster G. C., 1958: Effect of chloramphenicol on protein and nucleic acid synthesis in isolated thymus nuclei. *Biochim. Biophys. Acta*, **27**: 408.

De Moss J. A., Novelli G. D., 1955; 1956: An amino acid dependent exchange between inorganic pyrophosphate and ATP in microbial extracts. *Biochim. Biophys. Acta*, **18**: 592, **22**: 49.

Draculić M., Errera M., 1959: Chloramphenicol-sensitive DNA synthesis in normal and irradiated bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **31**: 459.

Gros F., Gros F., 1958: Role des amino acides dans la synthèse des acides nucléiques chez *Escherichia coli*. *Exptl. Cell. Res.*, **14**: 104.

Hahn F. E., Schaechter M., Ceglowski W. S., Hopps H. E., Ciak J., 1957: Interrelations between nucleic acid and protein biosynthesis. I. Synthesis and fate of bacterial nucleic acids during exposure to, and recovery from the action of chloramphenicol. *Biochim. Biophys. Acta.*, **26**: 469.

Hoagland M. B., 1955: An enzymic mechanism for amino-acid activation in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**: 288.

Horowitz J., Lombard A., Chargaff E., 1958: Some properties of an unstable *Escherichia coli* ribonucleic acid. *Fed. Proc.*, **17**: 245.

Lamborg M. R., Zamecnik P. C., 1960: Amino acid incorporation into protein by extracts of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **42**: 206.

Neidhard E. C., Gros F., Berg P., 1957: Metabolic instability of the ribonucleic acid synthesized by *Escherichia coli* in presence of chloromycetin *Biochim. Biophys. Acta*, **25**: 513.

Nisman B., Bergmann F. H., Berg P., 1957: Observations an amino acid--depent exchanges of inorganic pyrophosphate and ATP. *Biochim. Biophys. Acta*, **26**: 640.

Nisman B., 1959: Incorporation and activation of amino acids by disrupted protoplasts of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **32**: 18.

Pardee A. B., Paigen K., Prestidge L. S., 1957: A study of the ribonucleic acid of normal and chloromycetin-inhibited bacteria by zone electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**: 162.

Szafranski P., Sułkowski E., 1959: Activation of amino acids in various organs of the guinea pig. *Acta Biochim. Polon.*, **6**: 133.

Symposium on amino acid activation., 1958: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**: 67-104.

Marian Hierowski and *Zdzisław Stolzmann*

INFLUENCE OF CHLORAMPHENICOL UPON AMINO-ACIDS ACTIVATION IN *ESCHERICHIA COLI K-12a*

Summary

The influence of chloramphenicol on amino acids activation in *E. coli* was studied. The acetone powder preparations were prepared from bacteria as a source of „*pH 5* enzyme". The protein contents in enzymatic preparations was measured by the biuret method. The hydroxamic method was used to determine the rate of amino acids activation. It was shown that chloramphenicol (20 μg/ml) in the experimental conditions had no influence upon the activation of 14 examined aminoacids and their transfer to ribosomes (see Table I).

Adres autorów:
Authors' address:

Prof. dr Zdzisław Stolzmann,
Zakład Chemii Fizjologicznej
Akademii Medycznej w Poznaniu,
Poznań, ul. Święcickiego 6.
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 141—146

Janina Horodko, Barbara Mikiewicz, Krzysztof Naimski i *Kazimierz Zakrzewski*

WPŁYW JONÓW POTASU I SODU NA WYTWARZANIE TOKSYNY BŁONICZEJ

Z Centralnego Laboratorium Zjednoczenia Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed" w Warszawie

Wpłynęło dnia 6 lutego 1960 r.

Streszczenie

Wytwarzanie toksyny błoniczej jest wyraźnie uzależnione od stężenia jonów potasu w podłożu i od wzajemnego stosunku stężeń jonów potasu i sodu. Na zakres optymalnego stężenia potasu dla wytwarzania toksyny ma wpływ stężenie żelaza w podłożu.

Pomimo bardzo dużej ilości prac poświęconych zagadnieniu optymalnych warunków dla wytwarzania toksyny przez *Corynebacterium diphteriae*, wiadomości o wymogach co do poziomu jonów sodu i potasu w podłożu są bardzo skąpe. Zarówno sód jak i potas są z reguły obecne we wszystkich stosowanych podłożach. Mueller (1935) wzmiankuje o konieczności zachowania właściwego stosunku stężeń sodu do potasu. Wheeler i Mendez (1937) twierdzili, że obecność zarówno jonów sodu jak i potasu jest warunkiem koniecznym dla wzrostu *C. diphteriae*; zastąpienie większości jonów sodu przez potas zmniejszało wydajność toksyny. Żadnych dalszych szczegółowych prac na ten temat w dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono. Temat nie był prawdopodobnie podejmowany ze względu na trudności metodyki eksperymentalnej: produkcja toksyny błoniczej na syntetycznym podłożu przebiega z bardzo niską wydajnością, a więc w warunkach nie optymalnych, zaś podłoża naturalne względnie półsyntetyczne (hydrolizaty białkowe) zawsze zawierają znaczne ilości sodu i potasu.

Wprowadzenie wymienników jonowych dla regulacji poziomu żelaza pozwoliło na regulację zarówno poziomu sodu jak i potasu w podłożu,

a co za tym idzie, na przebadanie wpływu tych jonów na wytwarzanie toksyny.

BADANIA WŁASNE

Metody

Podłoże

Przygotowanie hydrolizatu: Kazeinę kwasową produkcji krajowej, klasy E (500 g) hydrolizowano w ciągu siedmiu godzin w temperaturze wrzenia w 8 N kwasie solnym (2 l). Stężenie azotu aminowego w stosunku do azotu całkowitego wynosiło po hydrolizie 75—80%. Kwas solny usuwano przez destylację próżniową, pozostałość po destylacji rozpuszczano w wodzie destylowanej, zobojętniano ługiem 6 N i sączono. Hydrolizat dla podłoży wolnych od sodu zobojętniano KOH, a dla podłoży pozbawionych potasu — NaOH.

Usuwanie żelaza: Żelazo z hydrolizatu, jak i z roztworów glikokolu i maltozy (potrzebnych do przygotowania podłoża) usuwano na wymienniku jonowym Escarbo podstawionym jonami sodu względnie potasu. Wymiennik podstawiony jonami sodu stosowano dla otrzymania pożywki pozbawionej jonów potasu, wymiennik podstawiony jonami potasu używano w celu otrzymania podłoża pozbawionego jonów sodu. Dla odżelazienia przepuszczano 1000 ml hydrolizatu przez kolumnę z wymiennikiem jonowym o wymiarach 1,5 × 100 cm. Zawartość żelaza w hydrolizacie odżelazionym wynosiła 0,1 μg — 0,5 μg Fe/ml. (Zawartość azotu całkowitego około 20 mg/ml.)

Skład podłoża: 1 l gotowego podłoża zawierał

1,1 g N całkowitego (hydrolizat kazeinowy)
1,5 g glikokolu
2 ml roztworu II Muellera
0,2 g cystyny
14 g maltozy
0,66 g jonów PO_4 (jako Na_2HPO_4 względnie K_2HPO_4)
0,038 g Ca^{++}
około 3,5 g Cl^-
od 0,05 do 0,125 mg jonów Fe^{++}.

Podłoże pozbawione sodu względnie potasu otrzymywano stosując hydrolizat i inne organiczne składniki uprzednio przepuszczone przez odpowiedni wymiennik (podstawiony potasem lub sodem) oraz dodając fosforan potasu lub sodu.

Szczep.

Szczep maczugowca błonicy *PW 8*, oznaczony w PZH Nr 556

Warunki hodowli

Hodowlę prowadzono w kolbach Erlenmeyera à 100 ml zawierających po 20 ml podłoża. Inkubowano 7 dni w 34°.

Metody analizy

Azot całkowity — oznaczano metodą półmikro-Kjeldahla.

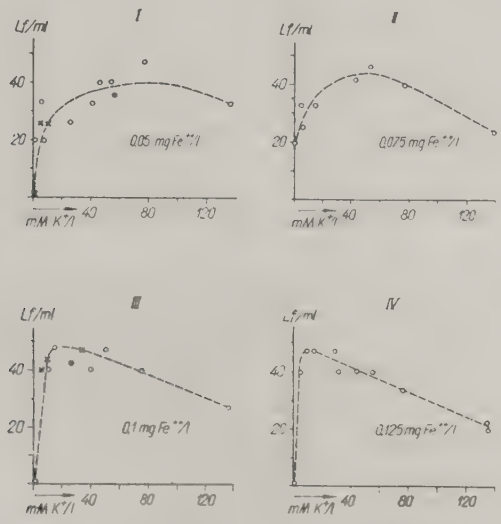
Azot aminowy — oznaczano metodą Pope Stevensa.

Żelazo oznaczano metodą fenantrolinową (Milton 1949).

Miano toksyny oznaczano metodą flokulacji wg Ramona w temp. 45°. (Surowica używana do odczynu flokulacji była wymianowana wg standardu międzynarodowego.)

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na wykresach I—IV (rys. 1) przedstawiono jak zmienia się poziom toksyny w podłożu w zależności od poziomu potasu i poziomu żelaza. Widoczne jest, że przy bardzo niskich stężeniach potasu produkcja toksyny jest zahamowana. Maksymalną wydajność toksyny osiąga się przy stężeniu potasu około 20—80 mM/l. Przy stężeniu potasu poniżej 5 mM/l i powyżej 80 mM/l wydajność toksyny znacznie spada. Ten spadek wydajności jest uzależniony od stężenia żelaza w podłożu.



Rys. 1. Wpływ stężenia potasu na wytwarzanie toksyny błoniczej

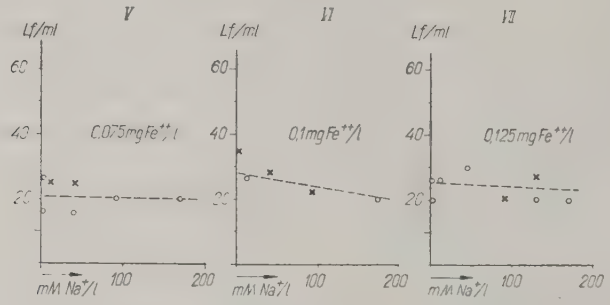
Fig. 1. Effect of potassium ions concentration on diphteria toxin production

Analogiczne doświadczenia z sodem, polegające na uzupełnianiu podłoża wolnego od sodu — chlorkiem sodu, dały wyniki odmienne. Jak to jest widoczne z wykresów V—VII (rys. 2) poziom toksyny jest niezależny od poziomu sodu w szerokim zakresie stężeń tego jonu.

Obydwa powyższe doświadczenia ilustrują niezbędność potasu a zbędność sodu dla wytwarzania toksyny błoniczej.

Celem uzyskania jaśniejszego obrazu zależności pomiędzy poziomem sodu i potasu a produkcją toksyny, przeprowadzono eksperymenty w ten

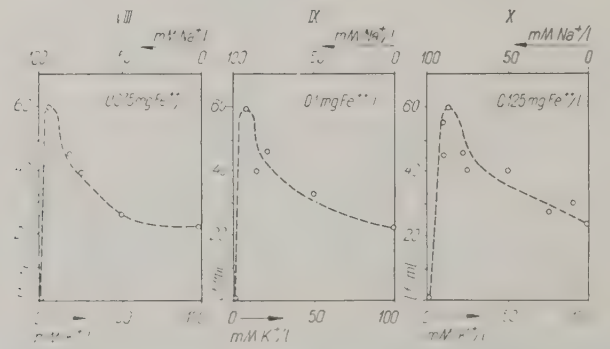
sposób, że w podłożu utrzymywano stałe stężenie jonów chlorowodorowych oraz stałe stężenie sumy jonów sodu i potasu; wzajemny stosunek stężeń sodu do potasu zmieniano w szerokich granicach przez mieszanie



Rys. 2. Wpływ stężenia jonów sodu na wytwarzanie toksyny błoniczej

Fig. 2. Effect of sodium ions concentration on diphteria toxin production

ze sobą w odpowiednich proporcjach podłóż zawierających wyłącznie jony potasu i wyłącznie jony sodu. Wyniki tych doświadczeń zilustrowano



Rys. 3. Wytwarzanie toksyny błoniczej w zależności od wzajemnego stosunku stężeń jonów K^+ i Na^+

Fig. 3. Effect of sodium to potassium ratio on toxin production

na rys. 3 (wykresy VIII—X). Jak widać, niezależnie od zmian poziomu żelaza w zakresie od 0,075 do 0,125 mg/l, charakter krzywych zależności pomiędzy wytwarzaniem toksyny a stężeniami sodu i potasu jest jed-

nakowy: w obszarze około 5—20 mM K /l i 95—80 mM Na l produkcja toksyny osiąga wyraźne maksimum.

Eksperymenty przedstawione powyżej, aczkolwiek w pełni ilustrują znaczenie sodu i potasu dla wytwarzania toksyny błonicznej, nie dostarczają liczb bezwzględnych co do progowych i optymalnych stężeń tych dwóch jonów. Usuwanie sodu względnie potasu na kolumnie z wymiennikiem jonowym obniża ich stężenie do bardzo niskich wartości, które być może są równe 0, ale nie mogą być oznaczone przy pomocy fotometru płomieniowego, ze względu na dużą nadwyżkę jonów sodu w płynach wolnych od potasu i odwrotnie. Wyraźna zależność produkcji toksyny od ilości dodawanych jonów potasu przemawia za słusznością przypuszczenia, że usunięcie danego jonu było kompletne.

Brak danych o nieodzowności względnie zbędności jonu sodowego w odżywianiu drobnoustrojów nie pozwala na porównanie zachowania się *C. diphteriae*, opisanego w niniejszej pracy, z innymi drobnoustrojami.

Informacje dotyczące roli potasu w odżywianiu drobnoustrojów są bardzo skąpe, wykazano jednak, że dla niektórych drobnoustrojów np. grupy *coli* — *paracoli, Pseudomonas* i *Serratia,* potas nie jest czynnikiem nieodzownym (Braun, Cahn-Bronner 1921, Rahn 1936), podczas gdy dla niektórych innych jak np. *Cl. acetobutylicum* (Davies 1942), *B. subtilis, Mycobacterium tuberculosis, Azotobacter, Rhizobium* (Rahn 1936) potas jest czynnikiem nieodzownym dla życia. Wydaje się, że — przynajmniej w odniesieniu do produkcji toksyny — *C. diphteriae* należy do tej ostatniej grupy.

LITERATURA

Braun H., Cahn-Bronner C. E., 1921: Über die synthetischen Fähigkeiten pathogener Bakterien und ihr biologisches Verhalten unter einfachen Ernährungsbedingungen. *Zentr. Bakter., I, 0,* **86**: 196.

Davies R., 1942: Studies on the acetone-butyl alcohol fermentation. III. Potassium as an essential factor in the fermentation of maize meal by *Cl. acetobutylicum*. *Bioch. J.,* **36**: 582.

Milton R. F., 1949: Methods of quantitative microanalysis E. Arnold Publ L. T. D. London.

Mueller J. H., 1935; Cultural requirements of bacteria. *J. Bact.,* **30**: 513.

Rahn O., 1936: Substitutes for potassium in metabolism of the lowest fungi. *J. Bact.,* **32**: 393.

Wheeler M. W., Mendez L., 1937: Growth and toxin production of the Dipht. bacillus in synthetic medium. — The effect of inorganic salts and carbohydrates. *J. Bact.,* **33**: 54.

Janina Horodko, Barbara Mikiewicz,
Krzysztof Naimski and *Kazimierz Zakrzewski*

THE INFLUENCE OF POTASSIUM AND SODIUM IONS ON DIPHTERIA TOXIN PRODUCTION

Summary

The report describes the influence of potassium and sodium ions on the production of toxin by *Corynebacterium diphteriae* strain *PW 8.*

C. diphteriae was grown on a modified Mueller's medium: 1,1 g N (casein hydrolysate), 1,5 g glycine, 2,0 ml Mueller's solution II, 0,2 g cystine, 14 g maltose, 0,66 g PO_4^{---} (Na_2HPO_4 or K_2HPO_4), 0,038 g Ca^{++}, about 3,5 g Cl^-, 0,05 to 0,125 mg Fe^{++}, water to 1 l. The acid hydrolysate of casein as well as the maltose and glycine solutions were freed of iron, potassium or sodium ions by passage through the cation exchanger on Na or K cycle. Medium free of potassium was prepared with a hydrolysate passed through Na-substituted column, while medium free of sodium — using a hydrolysate passed through K-substituted column. The contents of K^+, Na^+ and Fe^{++} were adjusted by adding appropriate salts to the final medium.

Cultures were incubated at 37° for 7 days in conical flasks (100 ml) containing 20 ml of medium.

The results are presented in Figures 1—3. The optimal range od potassium concentration for toxin production is between 5 mM and 80 mM, with sharp decrease beyond these limits (Fig. 1). This range is dependent upon the ferrous ion concentration. The experiments presented in Fig. 2 show that the production of toxin is independent of sodium concentration within the range 0—180 mM. When the concentrations of K^+ and Na^+ were changed simultaneously while maintaining their sum constant, a sharp optimum for toxin production could be observed (K^+ 5—20 mM, Na^+ 95—80 mM) (Fig. 3); the change of Fe^{++} concentration within the range 0,075—0,125 mg/l did not affect the optimal range.

The above results show that potassium is an essential ion for toxin production while sodium is not.

Adres autorów:
Authors' address:

Mgr Janina Horodko, Warszawa, Czarnieckiego 8.
Dr Barbara Mikiewicz, Warszawa, Mińska 33.
Doc. Dr Kazimierz Zakrzewski, Warszawa, Nowy Świat 41a.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 147—153

Wincenty Drożański

THE INFLUENCE OF BACTERIA ON THE EXCYSTMENT OF SOIL AMOEBAE

From the Department of General Microbiology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin

Received 12 February 1960

Summary

The excystment of soil amoebae is dependent upon the presence of bacteria, extract of disrupted bacteria or some aminoacids. Two-carboxylic aminoacids and arginine inhibit the excystment.

The process of excystment in protozoa is a complicated one. According to von Wagtendonk (1955) the phenomenon consists of following steps: the reactivation of protoplasm, the activation of enzymes and releasing of trophic forms from cysts' walls.

According to Crump (1950) and Dudziak (1955) the transition of amoebae from resting stage into an active one depends to the great extent upon such environmental factors as humidity, salt concentration, *pH*, temperature etc.

The process of excystment is also greatly influenced by the age of cysts and the presence of bacteria (Crump, 1950, Dudziak 1955, Kunicki-Goldfinger, Drożański, Błaszczak, Mazur and Skibińska 1957).

Singh. Mathew and Sreenivasaya (1956) have shown that amoebae may excyst not only in the presence of bacteria (*Aerobacter aerogenes*), but also under the influence of their metabolic products.

Similar observations were also made by Kunicki-Goldfinger *et al.* (1957) in the research on the effect of bacterial metabolites on the rate of excystment of soil amoebae.

Singh, Mathew and Anand (1958) have examined the nature of substances of bacterial origin that influenced the excystment in *Schizopyrenus russelli*.

The aim of present research was the study of the influence of the dead cells and of the extract of desintegrated cells of *A. aerogenes* upon the excystment of some kinds of soil amoebae.

MATERIALS AND METHODS

1. Amoebae cysts

Soil amoebae belonging to the family *Hartmannellidae* were used in the experiment; they have been already described by Drożański and Drożańska (1961).

The cysts were obtained from a 20—30 days' culture on non-nutrient agar slants. Suspensions of *A. aerogenes* cells killed by heating (60°) during 1,5 hours were used as food for amoebae. The cysts were separated from the substrate by centrifugation at 500 r. p. m. The cysts suspension free of bacteria were transfered on non-nutrient agar (1.5% agar washed in distilled water) in small Petri dishes.

The number of cysts that have germinated on that medium was ascertained by counting microscopically full and hollow cysts after an appropriate incubation time.

2. Preparation of extract from desintegrated *A. aerogenes* cells

A. aerogenes cells harvested from nutrient agar were centrifuged (6000 rev m for 30'), washed and resuspended in distilled water at the ratio 1 : 5. The cells were disrupted by a repeated freezing (—60°), and thawing. After breakage of approximately 60 per cent of cells, the suspension was cleared of unbroken cells and debris by centrifugation (6000 r m for 30 minutes). The supernatant was then sterilized by filtration through Seitz filter or by heating to 60° or 100° for 2—3 hours.

The free amino acids from desintegrate of *A. aerogenes* were obtained on the ionite column Dowex 50, and subsequent elution with 1 N ammonia solution. This amino acid mixture was used in further experiments on excystment.

The amino acids in the extract have been identified by two-dimensional paper chromatography (Whatman N° 1) with phenol saturated with water in the presence of ammonia vapours, or butanol, acetic acid and water (4 : 1 : 5) as solvents.

RESULTS

No excystment of examined soil amoebae in an environment free of bacteria was observed even at the optimal humidity, concentration of NaCl (0,5%), *pH* (6.8) and temperature (22°). The cysts germinated only after addition of bacteria or their extracts to the medium.

Results are shown on graph 1.

It is to be noted that the rate of excystment is much lower in the presence of the suspension of *A. aerogenes* cells killed previously by heating (100°) and then washed. The fraction of germinating cysts was

also low, when compared to the one observed either in the presence of living *A. aerogenes* cells or of their extracts.

The fraction of germinating cysts during the first few hours of observation was much higher in the presence of extract from disrupted bacteria than in the presence of living ones. The extract was not inactivated by heating to 100° for 2 hours and stimulated the excystment in the same degree as the original unheated extract.

These results and those of Singh *et al.* (1958) suggested the indispensability of a further analysis of the examined *A. aerogenes* extract.

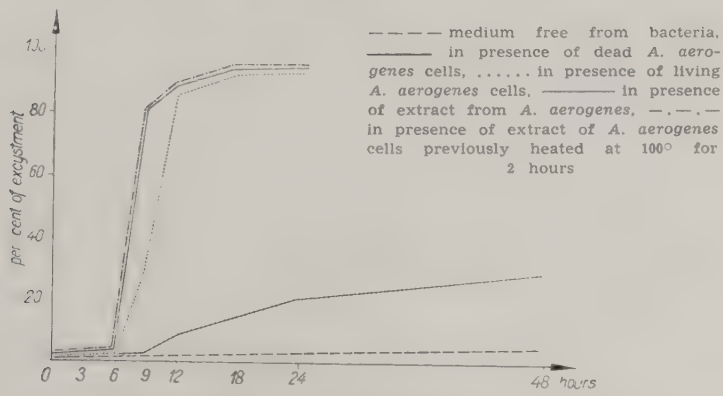

per cent of excystment
100
80
60
40
20
0
3
6
9
12
18
24
48 hours
— — — — medium free from bacteria,
——— in presence of dead A. aerogenes cells, ... in presence of living A. aerogenes cells, ———— in presence of extract from A. aerogenes, —.—.— in presence of extract of A. aerogenes cells previously heated at 100° for 2 hours

Fig. 1 — The relationship between the excystment of soil amoebae and the presence of bacteria or bacterial extract

In connection with this the works of Powell (1957), Hitzman, Halverson and Ukita (1957), Wolf and Thorley (1957), Woese, Morowitz and Hutchinson (1957) on germination of bacterial endospores and the paper of Singh *et al.* (1958), were reconsidered. Special attention was paid to the amino acid composition of the examined extract of *A. aerogenes* and to the influence of particular amino acids upon excystment of soil amoebae.

The indentification of the amino acids was conducted after preliminary purification of the extract (separation from protein, carbohydrates, and partial separation of mineral salts) by the two-dimensional ascending paper chromatography.

8 spots were obtained after developing the chromatograms with ninhydrine (0,15%, in acetone). See Table I.

Table I

Free amino acids content of the extract from *A. aerogenes*

Amino acid	Ri phenol-water NH_3	Ri BuOH—CH_3COOH—H_2O (4 : 1 : 5)
Aspartic acid	0,19	0,268
Glutamic acid	0,305	0,332
Serine	0:43	0,298
Arginine	1,04	0,258
Alanine	0,7	0,423
Tyrosine	0,72	0,608
Valine and methionine	0,96	0,769
Leucine, izoleucine and phenylalanine	1	1

Explanation: Ri for leucine = 1

The effect of individual amino acids (in concentration of 1 p. c.) and their mixture, qualitatively corresponding to the composition of free amino acid fraction in the extract, was then examined. Results are shown in table II.

Table II

Influence of different amino acids (in 1 p. c. concentration) on the excystment of soil amoebae

Amino acid	The per cent of excysted cells	
	strain of amoebae	
	B	*D*
d,l-Aspartic acid	0	0
Glutamic acid	0	0
Serine	65	45
Arginine	30	0
d,l-Alanine	.	10
Tyrosine	.	0
Valine	50	30
Methionine	70	55
Leucine	55	5
d,l-Izoleucine	.	10
d,l-β-Phenylalanine	50	0
Mixture of eleven amino acids *	20	15
Mixture of amino acids from *A. aerogenes* extract	80	75
Physiological solution	0	3

total concentration 1 p. c.

It was shown that the influence of individual amino acids upon the excystment of amoebae was varied. The excystment in strain *B* was distinctly stimulated by methionine (70 p. c.), serine (65 p. c.), leucine (55 p. c.), phenylalanine (50 p. c.) and valine (50 p. c. of excystment); in strain *D* — only by methionine (55 p. c.) and serine (45 p. c.). The influence of other examined amino acids was insignificant or null.

The greatest fraction of germinating cysts (80 and 75 p. c.) has been observed, when cysts were in contact with the mixture of amino acids obtained from purified extract of *A. aerogenes*.

It is worth consideration that some individual amino acids stimulated the excystment to a higher extent then the mixture of all eleven amino acids examined.

In this connection the rate of excystment (strain *D*) has been estimated on the medium containing the mixture of amino acids from *A. aerogenes* extract with the addition of these amino acids (1 p. c. concentration), that had no influence upon the process (Table III).

Table III

Inhibitive influence of some acids on the excystment in strain *D*

Amino acid added		Per cent of excystment
Mixture of amino acids from *A. aerogenes* +	d,l-Aspartic acid	4
	Glutamic acid	11
	Arginine	16
	d,l β-Phenylalanine	75
	none	75

The data presented in the table suggest that the excystment of amoebae of strain *D* may be inhibited by dicarboxylic amino acids (d, l aspartic, glutamic acid) and arginine. d, l *β*-phenylalanine had neither a stimulating nor an inhibitive effect.

CONCLUSIONS

The above described research has proved that

1. There was no excystment of examined soil amoebae, if the bacteria or some organic compounds were not present in the environment.

2. The fraction of excysted amoebae was similar in the presence of living bacteria and in presence of the extract of the disrupted ones.

3. The heating of the extract from *A. aerogenes* to 100° for 2 hours did not inactivate its stimulatory property.

4. Free amino acids isolated from the extract of *A. aerogenes* have a positive effect on excystment (average of 75—80 p. c.).

5. The stimulatory effect of individual amino acids on excystment was not so strong as that of an amino acid mixture, obtained from *A. aerogenes*. The influence of some of them (aspartic acid, glutamic acid and arginine) was, however, inhibitive.

6. The stimulation of the excystment by individual amino acids was different and was dependent upon the strain of amoebae used.

Acknowledgement

The author is greatly obliged to Dr T. Borkowski, Adjunct of the Department of Physiological Chemistry at the School of Medicine, Lublin, for kindly lending some missing amino acids.

LITERATURE

Crump L. M., 1950: The influence of bacterial environment on the excystment of amoebae from soil. *J. gen. Microbiol.*, **4**: 16.

Drożański W., Drożańska D., 1961: Bakterie martwe jako pokarm dla ameb. *Acta Microbiol. Polon.*, **10** (in press).

Dudziak B., 1955: Kiełkowanie i wzrost ameb w zależności od pokarmu bakteryjnego. *Acta Microbiol. Polon.*, **4**: 115.

Hitzman D. O., Halverson H. O., Ukita T., 1957: Requirements of production and germination of spores of anaerobic bacteria. *J. Bact.*, **74**: 1.

Kunicki-Goldfinger Wł., Drożański W., Błaszczak D., Mazur J., Skibińska J., 1957: Bakterie jako pokarm pełzaków, *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 331.

Singh B. N., Mathew S., Sreenivasaya M., 1956: Occurence and nature of amoebae excystment factor produced by *Aerobacter sp. Nature* (Lond.), **177**: 621.

Singh B. N., Mathew S., Anand N., 1958: The role of *Aerobacter sp., Escherichia coli* and certain amino acids in the excystment of *Schizopyrenus russelli., J. gen. Microbiol.*, **19**: 104.

Powell J. E., 1957: Biochemical changes occuring during spore germination in *Bacillus* species., *J. appl. Bacteriol.*, **20**: 349.

Woese C. R., Morowitz H. J., Hutchinson C. A., 1958: Analysis of action of l-alanine analogues in spore germination., *J. Bact.*, **76**: 576.

Von Wagtendonk W. J., 1955: Encystment and excystment of Protozoa., w Hunter S. H. i Lwoff A.: Biochemistry and Physiology of Protozoa., Academic Press Inc., New York.

Wolf J., Thorley C. M., 1957: The effects of various germination agents on the spores of some strains of *Bacillus subtilis., J. appl. Bacteriol.*, **20**: 384.

Wincenty Drożański

WPŁYW BAKTERII NA KIEŁKOWANIE CYST AMEB GLEBOWYCH

Streszczenie

Crump (1950), Dudziak (1957), Kunicki-Goldfinger i współprac. (1957), Singh i współprac. (1956 i 1958) wykazali wpływ bakterii na kiełkowanie cyst ameb wolno żyjących.

Celem naszej pracy było zbadanie wpływu martwych bakterii *Aerobacter aerogenes* oraz wyciągu z rozbitych komórek tych bakterii na kiełkowanie cyst niektórych ameb glebowych.

Wyniki przedstawione w wykresie 1 wskazują na to, że formy przetrwalne pochodzące z bezbakteryjnej hodowli ameb nie kiełkowały na nieodżywczym podłożu agarowym, jeżeli w środowisku brak było bakterii lub ich wyciągów.

Procent kiełkujących cyst był mały i proces ten przebiegał powoli, jeżeli czynnikiem pobudzającym do ekscystacji była zawiesina bakterii zabitych temperaturą 100° i odpłukanych od podłoża.

Cysty kiełkowały szybko i w dużym procencie w obecności żywych komórek *A. aerogenes* lub ich ekstraktów, uzyskanych przez zamrażanie bakterii do około —60° i przez następne ich odmrażanie.

Wyciąg z bakterii ogrzany do 100° przez 2 godziny nie ulegał inaktywacji i użycie jego dawało taką samą krzywą szybkości kiełkowania cyst jak wyciągu nie ogrzanego.

Z kolei wykazano, że wolne aminokwasy zawarte w wyciągu z *A. aerogenes* były w dużym stopniu odpowiedzialne za stymulację kiełkowania cyst ameb (średnio w 75—80%).

Skład jakościowy tych aminokwasów zbadano przy pomocy chromatografii bibułowej dwukierunkowej.

Dla wykazania wpływu poszczególnych aminokwasów na kiełkowanie cyst użyto 1% wodnych roztworów aminokwasów *in substantia*. Wyniki zestawione w tabeli II wskazują na to, że poszczególne aminokwasy oddziaływały z różnym natężeniem na kiełkowanie ameb. Wyraźnie pobudzały ekscystację ameb należących do szczepu *B*: metionina (w 70%), seryna (w 65%), leucyna (w 55%), fenyloalanina (w 50%) i walina (w 50%). Cysty ameb szczepu *D* kiełkowały dobrze tylko pod wpływem metioniny (w 55%) i seryny (w 45%). Działanie pozostałych aminokwasów było nieznaczne lub też nie stwierdzono go wcale. Wykazano w tabeli III, że niektóre aminokwasy (kwas d,l-asparaginowy i kwas d,l-glutaminowy oraz d,l-arginina) wywierały, w warunkach naszego doświadczenia, działanie hamujące na kiełkowanie i że d,l-fenyloalanina nie działała pobudzająco ani też hamująco na kiełkowanie cyst szczepu *D* ameb.

Author's address:
Adres autora:

Mgr Wincenty Drożański,
Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS,
Lublin, Al. Racławickie 20

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 155—160

Leon Jabłoński i *Stanisław Popławski*

BADANIA NAD KWASEM DEZOKSYRYBONUKLEINOWYM (*DNA*) PAŁECZEK *BRUCELLA*

WSTĘPNE PRÓBY TRANSFORMACJI *

Z Katedry Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Lublinie

Otrzymano 10 czerwca 1960 r.

Streszczenie

Z *Brucella bovis* S_{19} otrzymano dwiema metodami oczyszczone preparaty *DNA*. Preparaty wykazywały swoistość antygenową. W 2 na 27 przeprowadzonych prób udało się przy pomocy *DNA* przekazać cechę streptomycynooporności drogą transformacji.

WSTĘP

Transformację u bakterii udało się dotychczas wykazać na nielicznych modelach, jak np. *Streptococcus pneumoniae* (Griffith 1928), *Haemophilus influenzae* (Alexander i Leidy 1953), *Xanthomonas phaseoli* (Corey i współpr. 1957), *Streptococcus* (Bracco i współpr. 1957), *Staphylococcus* (Hotchkiss 1951). Transformację wykazano także u *E. coli*, u *Shigella*, u *Neisseria*. Tylko nieliczne cechy udało się przenieść z jednych bakterii na bakterie pokrewne za pośrednictwem *DNA*.

Braun, Burrous, Phillips (1957) donoszą o izolacji *DNA* z *Brucella* przy pomocy ekstrakcji fenolowej. Autorzy przyznają, że metoda nie jest doskonała, gdyż końcowy preparat zawierał około 25 procent białka (Phillips, Braun, Plescia 1958).

Zadanie jakie postawiliśmy sobie polegało na opracowaniu metody preparowania *DNA* oraz uzyskaniu nowego modelu bakteryjnego do prowadzenia transformacji. Podobieństwo między odmianami *Brucella bovis*. *suis* i *melitensis* oraz istnienie szczepu o ustalonej małej zjadliwości (S_{19}) mogłoby stworzyć możliwości otrzymania na drodze transformacji szczepu odpowiedniego do produkcji szczepionek.

* Zakładowi Antropozoonoz Instytutu Med. Pracy i Hig. Wsi dziękujemy za pomoc w uzyskaniu szczepów i wykonaniu niektórych analiz serologicznych (A. Kośiak).

BADANIA WŁASNE

Metody

Do badań użyto szczepu *Brucella bovis* S_{19} charakteryzującego się następującymi cechami: wzrost bez dodatku CO_2, wytwarza H_2S w ciągu 5 dni, mocznik hydrolizuje w ciągu 2 minut, rośnie na podłożu z fuksyną, nie rośnie na podłożu z tioniną, aglutynowany w surowicy anty-*bovis* 1/25 +++, 1/50 ++, 1/100 +, w surowicy anty-*melitensis* nie ulega zlepianiu. Wykazuje stałość cech biochemicznych i serologicznych, oraz małą zjadliwość.

Hodowlę prowadzono w 50 butlach Roux na agarze Brauna. Wysiewano 24-godzinną hodowlę kolonii fazy *S*. Butle inkubowano w 37° przez 48 godzin. Po tym czasie wzrost zmywano 2 procentowym roztworem cytrynianu sodu, lub roztworem o składzie: chlorek sodu 8,12 g, cytrynian sodu 4,00 g, woda destylowana 1000,0 ml. (Odczynnik A). Zawiesinę bakterii wirowano przez 20 minut przy 3 tys. obr./min. Osad przemywano dwa razy roztworem soli o podanym wyżej składzie. Osad bakterii zawieszano w 400 ml roztworu A, przelewano do butli polietylenowych i zamrażano w mieszaninie etanolu ze stałym CO_2 (—70°), po czym próbki zanurzano w wodzie o temperaturze +40° i przy ciągłym mieszaniu ogrzewano do rozpuszczenia lodu. Zamrażanie powtarzano 12 razy i pod mikroskopem kontrolowano ilość całych komórek. Z kolei zawiesinę wirowano (4000 obr./min.) przez 20 minut w temperaturze +4°. Płyn odrzucano. Osad przemywano jeden raz roztworem A i wirowano jak wyżej.

Osad zawieszano w ochłodzonym do +4° roztworze B, o składzie: chlorek sodu ch. cz. 175,20 g, cytrynian sodu ch. cz. 4,00 g, woda destylowana 1000,0 ml. Zawiesinę w roztworze B zamrażano i odtajano 5 do 8 razy.

Po odmrożeniu nukleoproteidy wytrącano z roztworu równą ilością 96 procentowego etanolu. Wytrącone nukleoproteidy mają włóknistą strukturę i łatwo dają się oddzielić od płynu przez nakręcenie na bagietkę. Wytrącone nukleoproteidy rozpuszczano w roztworze B przez łagodne wstrząsanie. Celem oddzielenia polisacharydów nukleoproteidy ponownie wytrącano etanolem i rozpuszczano w roztworze B. Odbiałczano metodą Sevaga i współpr. (1939).

Do badań serologicznych *DNA* odbiałczano około 20 razy, aż do zaniku błonki białkowej na chloroformie. Do prób transformacji, *DNA* odbiałczano 4—6 razy. Odbiałczony *DNA* wytrącano etanolem i rozpuszczano w jałowej soli fizjologicznej. W celu oddzielenia resztek *RNA* posłużono się węglem aktywowanym — według metody Zamenhofa (1956). W razie potrzeby *DNA* wyjaławiano w 50 procentowym etanolu przez 24 godziny w temperaturze +4°. Rozpuszczano w jałowej soli fizjologicznej. Otrzymany preparat używano do badań.

Równocześnie opracowano drugą metodę rozbijania komórek *Brucella* przy pomocy dezoksycholanu sodu. Zawiesinę bakterii w roztworze B traktowano dezoksycholanem sodu *in substantia* do stężenia 1 procentowego i ogrzewano w temperaturze 60° przez 30 minut. W tym czasie masa bakteryjna przybierała galaretowatą konsystencję. Rozbite komórki oziębiano do +4°, a nukleoproteidy wytrącano równą objętością etanolu. Dalsze oczyszczanie przeprowadzano podobnie jak po rozbiciu zamrażaniem. Metoda ta jest mniej pracochłonna, ale także mniej wydajna.

CHARAKTERYSTYKA *DNA* PAŁECZEK *BRUCELLA*

Preparat badano chemicznie w celu określenia jego ilości. Z każdą serią wykonywano próbę dwufenylaminową według metody Dieschego (1944) i próbę z chlorowodorkiem cysteiny według Stumpfa (1947). Ilość dezoksyrybozy w stosunku do *DNA* wzorcowego (grasiczego) wyno-

siła od 500 do 1200 gamma na ml badanego roztworu. Zawartość azotu oznaczano według metody mikro-Kjeldahla — wynosiła ona od 13,5 do 15,4%. Zawartość fosforu badano według mikro-metody Briggsa (1922) — wynosiła ona od 8,45 do 9,05%.

Lepkość względną *DNA* badano w wiskozymetrze Ostwalda w temperaturze 25° w stosunku do 0,85% NaCl. Wskaźnik lepkości wahał się, zależnie od serii preparatu, od 2,3 do 3,5 przy zawartości *DNA* 0,5 mg na ml.

Próbę na specyficzność i stopień polimeryzacji preparatu wykonano za pomocą dezoksyrybonukleinazy. Dodawano 1 jednostkę enzymu na 1 ml preparatu, a spadek lepkości badano po 5, 10 i 30 minutach działania enzymu (temperatura 25°, zawartość *DNA* 0,5 mg na ml). Po 30 minutach działania enzymu lepkość obniżała się znacznie, np. preparat wykazujący wskaźnik lepkości względnej 3,5, po zadziałaniu enzymem wykazywał lepkość 2,9, co świadczyło o wysokim stopniu polimeryzacji badanego *DNA*.

W seriach preparatu poddawanych badaniu serologicznemu zawartość zanieczyszczeń białkowych kontrolowano metodą Piotrowskiego, celem stwierdzenia obecności wiązań peptydowych, wykonywano próby z ninhydryną na obecność wolnych aminokwasów, wykonano także immunoelektroforezę preparatu według Grabara i Williams (1953). Do immunoelektroforezy używano 0,2 ml preparatu, który poddawano działaniu prądu o napięciu 5 V/cm przez 10 godzin, a następnie w rowek wyżłobiony w agarze dodawano surowicę konia uodpornionego surowicą ludzką. Nie stwierdzono obecności wstęg precypitacyjnych. Wykonano także hydrolizę preparatu w 6 N HCl w 100° przez 24 godziny, hydrolizat zagęszczano dziesięciokrotnie i za pomocą chromatografii bibułowej poszukiwano aminokwasów. Chromatogramy wywoływane ninhydryną wykazywały obecność tylko dwu plam, których nie udało się zidentyfikować.

Wykazano aktywność serologiczną otrzymanego *DNA*. Podany jednorazowo, w ilości 2 ml, domięśniowo królikom powoduje po 7 dniach powstawanie przeciwciał, dających się wykazać w odczynie wiązania dopełniacza. Miano surowicy króliczej po 7 dniach wynosiło 1 : 30, po 14 dniach 1 : 10.

PRÓBY TRANSFORMACJI U *BRUCELLA*

Do badań nad transformacją użyto *Brucella bovis* S_{19}, z którego otrzymano mutant streptomycynooporny metodą płytek gradientowych (Szybalski i Bryson 1952). Drogą pasaży uzyskano szczep oporny na 40.000 γ streptomycyny w 1 ml pożywki. Szczep był nadal streptomycynooporny po 20 cotygodniowych pasażach na podłoże bez streptomycyny. Z tego szczepu wyosobniano *DNA*. Szczep wyjściowy, wrażliwy, badano w kierunku wytwarzania mutantów spontanicznych opornych na strep-

tomycynę. W tym celu zawiesinę pałeczek, o gęstości 1×10^7 żywych komórek w 1 ml, wysiewano na podłoże ze streptomycyną w ilości 300 γ na ml. Częstość mutacji wynosiła przeciętnie $1 : 10^8$.

Transformację przeprowadzano w następujący sposób: Do 0,5 ml 6-godzinnej hodowli znajdującej się w logarytmicznej fazie wzrostu dodawano 0,5 ml (2,5 γ) *DNA* ze szczepu streptomycynoopornego. Następnie dodawano 0,5 ml ewentualnego kofaktora transformacji w odpowiednim stężeniu, oraz 8,5 ml ogrzanego do 37° bulionu. Tak przygotowaną hodowlę inkubowano w cieplarce przez 6 godzin. Równocześnie wykonywano kontrolę jałowości *DNA*, kontrolę żywotności szczepu na płytkach bez streptomycyny oraz kontrolę zdolności szczepu wyjściowego (biorca) do mutacji spontanicznych w warunkach doświadczenia. Po 6 godzinach wysiewano po 0,5 ml badanej hodowli na płytki agarowe zawierające 100 γ streptomycyny w 1 ml.

Transformację udało się uzyskać dwukrotnie na 27 wykonanych prób. W obu pozytywnych doświadczeniach jako ewentualnego kofaktora użyto 5-procentowej surowicy baraniej. Mimo powtarzania doświadczeń w podobnych warunkach więcej razy transformacji nie udało się uzyskać. Pierwszy raz uzyskano transformację za pomocą *DNA* otrzymanego metodą zamrażania bakterii. Ilość kolonii transformowanych wynosiła 1 : 200. Przy użyciu *DNA*, otrzymanego za pomocą rozbicia bakterii dezoksycholanem sodu, uzyskano transformację raz na 21 wykonanych prób. Ilość kolonii wynosiła 1 : 600.

Celem usunięcia ewentualnych inhibitorów transformacji oczyszczono bulion wątrobowy według dwóch metod. 1. Ustalono *pH* podłoża (wyciąg wątrobowy) na 3,0 i adsorbowano trzykrotnie 1% węglem aktywnym, następnie ustalano *pH* na 8,0, dodawano 0,02% $CaCl_2$ i po ogrzaniu do 37° odsączano. Ustalano *pH* na 7,2 i wyjaławiano. 2. Ustalano *pH* na 3,0, adsorbowano trzykrotnie węglem aktywowanym, ustalano *pH* na 7,2, sączono przez bibułę, wyjaławiano i używano do prób.

Jako kofaktorów transformacji dodawano do bulionu wątrobowego: 5-procentowe surowice — końską, bydlęcą i baranią; 0,05 i 0,1-procentowy neopepton, 0,1-procentowy hydrolizat kazeiny, 0,1-procentową albuminę jaja kurzego i albuminę zwierzęcą, witaminę B_{12} w ilości 1 γ na ml. Poza wyżej przedstawionymi wynikami, transformacji nie uzyskano przy oddzielnym ani łącznym podawaniu wymienionych składników.

WNIOSKI

Wykazano serologiczną aktywność *DNA* wyosobnionego z *Brucella*, który użyty jako antygen wywoływał powstawanie swoistych przeciwciał, dających się wykryć odczynem wiązania dopełniacza.

Próby transformacji cechy streptomycynooporności wypadły pozytywnie w dwóch na dwadzieścia siedem wykonanych doświadczeń. Mała

częstość i przypadkowość występowania transformacji u *Brucella* wskazują, że zagadnienie to wymaga dalszego, dokładniejszego opracowania. Powszechnie używane czynniki jako kofaktory nie wystarczają tu do wywoływania transformacji.

Dalsze badania nad transformacją u *Brucella* są w toku.

LITERATURA

Alexander, H. E., Leidy, L., 1953: Induction of streptomycin resistance in sensitive *Hemophilus influenzae* by extracts containing deoxyribonucleinic acid from resistant *Hemophilus influenzae*. *J. Exptl. Med.*, **97**: 17.

Bracco, M. R., M. R. Krauss, A. S. Roe and C. M. Mac Leod, 1957: Transformation reactions between pneumococcus and three strains of streptococci. *J. Exptl. Med.*, **106**: 247.

Briggs, A. P., *Biol. Chem.*, 1922, **53**: 13, cyt. za O. Lindberg, L. Ernster, 1956: Determination of organic phosphorus compounds by phosphate analysis. Methods of Biochemical Analysis 3 : 1.

Braun, W., Burrous W. J., Phillips H. J., 1957: A phenolextracted bacterial deoxyribonucleinic acid. *Nature*, **180**: 1356.

Corey Reece R., M. P. Starr, 1957: Genetic transformation of streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. *J. Bact.*, **74**: 146.

Diesche Z., 1944: Two characteristic and sensitive colour reactions between sulfhydrol compounds of thymonucleic acid. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **55**: 217.

Grabar, P., Willams, C. A., 1953: Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines; application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**: 193.

Griffith, F., 1928: The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* (Camb.), **27**: 113.

Hotchkiss R. D., 1951: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **16**: 457.

Phillips, H. J., Braun W., Plescia J. O., 1958. Antigenity of a bacterial *DNA*, *Nature*, **181**: 573.

Sevag, M. G., Lackman, B. D., Smolens, J., 1938, cyt. za A. Tiselius 1939: The chemistry of proteins and amino acids. *Ann. Rev. Bioch.*, **3**: 1.

Stumpf, P. K., 1947: Colorimetric method for the determination of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, **169**: 367.

Szybalski, W., Bryson, V., 1952: Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. *J. Bact.*, **64**: 489.

Zamenhof, S., 1956: Biology and biophysicial properties of transforming principle. Progress in Biophysics and Biophysicial Chemistry, **6**: 85.

Leon Jabłoński and *Stanisław Popławski*

DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN *BRUCELLA*. PRELIMINARY STUDY OF TRANSFORMATION

Summary

Two methods of disrupting *Brucella* cells and isolating of crude *DNA* extract are described. Extracts were deproteinized and partially purifyied. The obtained

DNA preparation, free of detectable proteine impurities, was shown to be antigenically active.

The *DNA* isolated from streptomycin-resistant mutant of *Brucella* was able to transfer this new property to the streptomycin susceptible acceptor strain. The transformation was observed only in the presence of sheep serum as a cofactor, and only in few among many experiments.

Adres autorów:
Authors' address:

lek. Leon Jabłoński,
Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej, Lublin, Lubartowska 85.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 161—168

Marian Decowski

WYTWARZANIE HIALURONIDAZY PRZEZ WŁOSKOWCE RÓŻYCY

II. NIEKTÓRE WŁAŚCIWOŚCI ENZYMU*

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Wpłynęło dnia 4 lutego 1960 r.

Streszczenie

Optymalne *pH* dla wytwarzania hialuronidazy przez włoskowce leży około 8,2 Hialuronidaza włoskowców może być enzymem konstytucyjnym lub adaptacyjnym Adaptacja enzymatyczna zachodzi również w organizmie zwierzęcia zakażonego

W poprzednim doniesieniu (Decowski, Sozański 1958) podano wyniki badania nad wytwarzaniem hialuronidazy przez kilka szczepów włoskowców różycy.

Badania te zostały rozszerzone w celu poznania niektórych właściwości hialuronidazy wytworzonej przez wybrane szczepy.

METODA

Ponieważ bulion na końskim mięsie z dodatkiem 3% surowicy końskiej okazał się nieodpowiedni, stosowano podłoże oznaczone symbolem *CTT* o składzie: Bacto-casitone 10 g, Bacto-Tryptose 10 g, Bacto-Tryptone 5 g, bezwodny dwuzasadowy fosforan sodu 3 g, sól kuchenna 2 g, glikoza 1 g, woda dest. 1000 g, *pH* 8,0—8,2. W razie potrzeby dodawano 2,5% agaru.

Oznaczanie hialuronidazy

Do badań zastosowano własną modyfikację metody „*ACRA*" podanej przez Burnetta, a szczegółowo opisanej w poprzednim doniesieniu (Decowski, Sozański 1958). Wadą tej metody jest konieczność stosowania świeżych płynów synowialnych w celu uniknięcia samoczynnej depolimeryzacji kwasu hialuronowego (*KHi*) i zmian jego lepkości podczas przechowywania. Stosowane substraty pochodziły od różnych zwierząt, wykazując różne stężenia *KHi*. Z tej przyczyny oryginal-

* przy technicznej pomocy Hanny Kowalskiej

na metoda „*ACRA*" nadaje się wyłącznie do jednoczesnych badań kilku preparatów. Stosowanie jej do badań tego samego materiału w ciągu dłuższego czasu nie daje pewnych wyników.

Dla usunięcia tej wady wprowadzono jako własną modyfikację miareczkowanie *KHi* wobec standardu hialuronidazy (*Hi*). Jako standardowy preparat *Hi* służył zliofilizowany przesącz bulionowej hodowli włoskowca różycy (*HiS*).

Przed każdym badaniem miareczkowano płyn synowialny w stosunku do *HiS*. Rozcieńczano go fizjologicznym roztworem soli kuchennej w postępie geometrycznym, począwszy od 1 : 12,5, po czym po 0,25 ml z każdego rozcieńczenia dodawano do 0,25 ml *HiS* rozcieńczonej fizjologicznym roztworem NaCl w stos. 1 : 100. Po 1 godzinnym ogrzewaniu w łaźni wodnej w 37°, przyjmowano jako miano *KHi* najwyższe rozcieńczenie płynu synowialnego, wykazujące skrzep w postaci pierścienia po rzuceniu kropli mieszaniny na kwaśny alkohol. W drugim, kontrolnym szeregu, nastawianym i ocenianym w identyczny sposób, zastępowano *HiS* równoważną ilością fizjologicznej soli. Miano kontroli bywało przeważnie 4 razy wyższe od miana z *HiS*. Odrzucano płyn synowialny wykazujący identyczne miana w obydwu miareczkowaniach lub wykazujący odchylenia w stosunku do pierwotnego badania próbki.

Płyn synowialny

Próbki pobrane ze stawów nadgarstkowych kilku sztuk bydła mieszano w ciągu 30 minut na elektrycznym mieszadle, wirowano przez 30 minut przy 10 tys. obrotach/min i płyn z nad osadu przechowywano w +4° pod toluenem. Niekiedy, przy wtórnym wytrąceniu się włóknika, zachodziła potrzeba powtórnego wirowania po kilkunastu dniach przechowywania. W ten sposób przechowywany płyn synowialny zdatny był do użytku w ciągu 2 miesięcy lub dłużej.

WYNIKI BADAŃ

1) Wpływ *pH* na wytwarzanie *Hi* w płynnych hodowlach

Podłoże *CTT* o różnym *pH* zasiano 24 godzinną hodowlą szczepów *R/65* i *R/87*, otrzymanych z Zakładu Chorób Świń Instytutu Weterynarii, i po 4 dniach hodowania wyznaczano ilość *Hi* w przesączu hodowli oraz procent względnego zmetnienia hodowli, określanego w nefelometrze Pulfricha z filtrem nr 2 i wzorcem nr 3. Wyniki ujęte są w tabeli I, będącej wyciągiem jednego z doświadczeń.

Wyniki wskazują na wyraźne zwiększenie wytwarzania *Hi* w miarę wzrostu *pH*, przy czym najwyższe stężenie enzymu uzyskano przy *pH* 8,2, przy którym włoskowiec różycy znajduje lepsze warunki wzrostu. Zwraca uwagę stosunek stężenia *Hi* i względnego zmętnienia (R), różny u obu szczepów, zwłaszcza w niskich *pH*. Możliwe, że autoliza komórek szczepu *R/87* przebiega szybciej niż szczepu *R/65*. Wyrazem tego jest stosunkowo duża ilość *Hi* przy małej ilości komórek. Szczep *R/65* prawdopodobnie jest znacznie oporniejszy, nie ulega tak szybkiej autolizie, lecz w zamian posiada silniej rozwinięte właściwości enzymogenne.

2) Wytwarzanie hialuronidazy adaptacyjnej

Przez dodatek *KHi* do podłoża można u niektórych gatunków bakterii pobudzić wydzielanie *Hi* lub je spotęgować. Zagadnieniem tym zajmo-

Tabela I

Wpływ *pH* podłoża na wytwarzanie hialuronidazy
Effect of *pH* of the medium on production of hyaluronidase

	Szczep *R/65* Strain *R/65*			Szczep *R/87* Strain *R/87*		
pH podłoża *pH* of medium	*pH* 4 dniowej hodowli *pH* after 4 days of incubation	miano *Hi* *Hi*-titer	*R*	*pH* 4 dniowej hodowli *pH* after 4 days of incubation	miano *Hi* *Hi*-titer	*R*
6,5	6,1	1 : 10	520	6,15	1 : 80	210
7,0	6,5	1 : 160	761	6,5	1 : 160	247
7,5	6,7	1 : 160	1511	6,6	1 : 160	428
7,8	6,7	1 : 320	1696	6,6	1 : 160	613
8,2	7,25	1 : 640	1805	7,1	1 : 320	684

Hi — hialuronidaza; *Hi* — hyaluronidase.
R — % względnego zmętnienia w stosunku do wzorca nr 3.
R — p.c. of relative turbidity of standard No 3.

wało się wielu autorów. Według nich adaptacji podlega *Hi Cl. perfringens* (Mc Clean i Halle 1941, Rogers 1945) oraz paciorkowca grupy *A* (Rogers 1945) i to w stosunku wprost proporcjonalnym do ilości *KHi*. Sellers (1949) oraz Meyer i Rapport (1952) nie stwierdzili jednak tego zjawiska u mało zjadliwych paciorkowców grupy *B*. U gronkowców oraz laseczki septycznej dodatek *KHi* nie wpływa na wytwarzanie *Hi* (Rogers 1945). Do wręcz odwrotnych wniosków dochodzą Zabłocki i Rolicka (1952), udowadniając, że szczepy gronkowca złocistego reagują wzmożeniem wytwarzania *Hi* na obecność *KHi*. Podobnie Ber i współpr. (1958) znaleźli adaptację enzymatyczną kilku szczepów gronkowca złocistego, chociaż zjawisko to nie występowało u gronkowców białych i niektórych złocistych. Gibian (1945) cytuje kilka prac, świadczących o obecności adaptacyjnego enzymu u włoskowca różycy.

Badania własne przeprowadzono na 8 szczepach otrzymanych z Zakładu Chorób Świń Instytutu Weterynarii. Jako podłoża użyto *CTT* z dodatkiem 0,02% *KHi*, zasianego 1 ezą 24-godzinnej hodowli płynnej. Pomiarów *Hi* dokonywano po 4-dniowej inkubacji. Wyniki ujęte są w tabeli II.

Zwiększenie dawki *KHi* przy powtórnym badaniu szczepu *R/80* nie wpłynęło na zmianę wyniku.

Z powyższego zestawienia wynika, że trafiają się szczepy włoskowca różycy zdolne do adaptacyjnego tworzenia enzymu, jak również nie po-

Tabela II

Wpływ kwasu hialuronowego (0,02%) na wytwarzanie hialuronidazy
Effect of hyaluronic acid (*KHi*) on the production of hyaluronidase (*Hi*)

Symbol szczepu Strain	Miano — Titer	
	Podłoże z *KHi* Medium with *KHi*	Podłoże kontrolne bez *KHi* Medium without *KHi*
R/47	1 : 160	1 : 160
R/49	1 : 320	1 : 80
R/57	0	0
R/65	1 : 1280	1 : 80
R/70	0	0
R/80	0	0
R/87	1 : 640	1 : 80
Staub	0	0

siadające tej właściwości. Nasilenie adaptacji jest różne w zależności od indywidualnych cech szczepu.

Godne zainteresowania jest, czy podobnie zachowują się poszczególne szczepy *in vivo* w reakcji z *KHi* znajdującym się w tkance zwierzęcej. W tym celu 4 wybrane szczepy przepasażowano pięciokrotnie przez białe myszki (po 2 sztuki), bezpośrednio ze zwierzęcia na zwierzę, stosując jako dawkę szczepienną 0,1 g roztartej tkanki wątrobowej padłego zwierzęcia. Następnie porównano zjadliwość szczepów macierzystych i ich aktywność wytwarzania *Hi* z analogicznymi cechami szczepów reizolowanych z padłych zwierząt po ostatnim, piątym pasażu. Wyniki ujmuje tabela III.

Przy ocenie wyników należy zwrócić uwagę na charakterystyczny stosunek właściwości wytwarzania *Hi* do zmian w zjadliwości szczepu. U wszystkich szczepów zjadliwość ulega mniej lub więcej silnemu spotęgowaniu, lecz tylko u dwóch (*R/80* i *R/87*) zaobserwowano pojawienie się lub zwiększenie aktywności *Hi*. Z całości doświadczenia widać, że w zastosowanych warunkach nie ma korelacji między wytwarzaniem *Hi* a zjadliwością szczepu. Adaptacyjna reakcja tworzenia enzymu pod wpływem *KHi* jest taka, jaką znajdujemy *in vitro*. Wyjątek stanowi szczep *R/80*. Ponieważ w dalszych badaniach stwierdzono, że szczep ten w wyniku pasażowania uzyskał ustaloną, wysoką zjadliwość oraz właściwości wytwarzania *Hi*, należy przypuścić, że jego forma macierzysta stanowiła jedynie przejściową modyfikację wynikającą z czasowego wpływu środowiska.

3) Wpływ czasu przechowywania na stałość hialuronidazy

Jak wynika z danych w piśmiennictwie hialuronidaza pochodzenia bakteryjnego jest bardziej stabilna niż pochodzenia jądrowego, zwłaszcza gdy ta ostatnia zostanie oczyszczona (Mc Cullogh i współpracow. cyt. wg Beyer i Rapport, 1952). W stanie nieoczyszczonym *Hi* jądro-

Tabela III

Wpływ pasażowania szczepów włoskowca różycy przez białe myszy na wytwarzanie hialuronidazy

Effect of animal passage of *E. rhusiopathiae* on the production of hyaluronidase

Symbol szczepu Strain		Dawka szczepienna (0,2 ml) z rozcieńczeń 24 godzinnej hodowli bulionowej (około 10^9 komórek/ml) Inoculation dosis — 0,2 ml of appriopriate dilution of 24-hours broth culture (ca 10^9 cells per 1 ml)					
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	Miano *Hi* *Hi* - Titer
R/47	W	0/0	3/0	1/0	0/0	5/0	1 : 160
	P	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1 : 160
R/57	W	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	0
	P	3/3	3/4	5/5	3/3	3/3	0
R/87	W	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1 : 80
	P	5/5	3/5	3/5	3/5	3/5	1 : 320
R/80	W	0/0	0/0	4/0	0/0	0/0	0
	P	4/4	4/4	4/4	4/4	5/5	1 : 320

W — przed pasażowaniem
before passage
P — po pasażowaniu
after passage

O — myszki przeżyły
np. $^3/_5$ — jedna myszka padła 3. druga 5 dnia
numerator — day of the death of first mouse
denominator — day of the death of second mouse

wa jest znacznie oporniejsza (Freeman i współpr. 1949, 1952) i daje się dobrze przechowywać przy *pH* 4,5—5,0 w ciepłocie poniżej —5° lub w stanie zamrożenia (Tolksdorf i współpr. 1950). Dodatek białka np. żelatyny lub albuminy surowicy bydlęcej do oczyszczonej *Hi* jądrowej wybitnie zwiększa jej stabilność (Freeman i współpr. 1952). *Hi* paciorkowców grupy *A* i *C* przy *pH* 4,6 szybko traci aktywność, jest jednak względnie stabilna przy przechowywaniu w środowisku o *pH* 7,0 (Halle, 1944).

6-dniową hodowlę szczepu *R/65* (*pH* 7,2) na bulionie z dodatkiem surowicy końskiej przesączono przez sączek Seitza „K" i zakonserwowano

mertiolatem (0,01%). Uprzednio wykazano, że mertiolat zachowuje się obojętnie wobec enzymu, co zresztą zostało również stwierdzone w stosunku do hialuronidaz innego pochodzenia (Zabłocki i Rolicka 1952).

Przesącz, przechowywany w szczelnie zakorkowanej butelce w temperaturze pokojowej w ciemni, badano co kilka dni w ciągu miesiąca i nie stwierdzono żadnych zmian w aktywności enzymu. W następnej próbce (*pH* 7,2) otrzymanej z hodowli na podłożu *CTT*, przechowywanej w ten sam sposób, nie zauważono żadnych zmian w ciągu 1½ roku.

Stwierdzono zatem, że aktywność *Hi* zawartej w przesączach hodowli włoskowca różycy nie ulega zmianom w ciągu długiego czasu przechowywania w ciepłocie pokojowej. Fakt ten może mieć znaczenie w zastosowaniu *Hi* w tej postaci, jako standardu do oznaczania miana *KHi* w płynie synowialnym.

Tabela IV

Wpływ temperatury na aktywność hialuronidazy
Effect of temperature on hyaluronidase

Temperatura Temperature	Miano *Hi* *Hi* — titer czas ogrzewania w minutach time of heating, minutes			
	10	20	30	40
42°	1:200	1:200	1:200	1:200
45°	1:200	1:200	1:200	1:200
47,5°	1:10	0	0	0
50°	0	0	0	0
60°	0	0	0	0

4) Wpływ temperatury na inaktywację hialuronidazy.

Wrażliwość na działanie temperatury hialuronidaz pochodzenia jądrowego i bakteryjnego jest różna, przy czym stwierdzono, że *Hi* bakteryjne są bardziej termolabilne (Meyer i Rapport, 1952). Dorfman i Ott (1948) wykazali, że przy podniesieniu temperatury od 18 do 30° aktywność *Hi* jądrowej obniża się dwukrotnie. Temperatura 65° w pełni, a 60° częściowo hamuje działanie enzymu (Meyer i Rapport 1952). Ta sama temperatura inaktywuje *Hi* pneumokokową. Wrażliwość enzymu zależna jest od stopnia jego czystości. Oczyszczone preparaty są wrażliwsze; oporność ich na działanie temperatury można jednak zwiększyć przez dodatek koloidów, takich jak żelatyna lub albuminy (Freeman i Webster 1952). Zabłocki i Rolicka (1952) przyjmują, że 60° osłabia aktywność hialuronidaz, temperatura 100° zaś

w pełni je niszczy. Optimum działania enzymu przypada na temperaturę 30—40° (Gibian 1954).

Badania własne przeprowadzono nad przesączami 4-dniowych hodowli 4 szczepów włoskowca, które oddzielnie poddawano ogrzewaniu w łaźniach wodnych o różnych ciepłotach przez różny przeciąg czasu. Uzyskano jednakowe wyniki, które przedstawione są w tabeli IV. *pH* przesączów wynosiło przeciętnie 7,2.

Z doświadczenia wynika, że punkt krytyczny dla *Hi* włoskowca różycy jest ostro zarysowany i znajduje się w temperaturze 47,5°.

WNIOSKI

Optimum wytwarzania hialuronidazy w hodowlach płynnych włoskowca różycy znajduje się przy *pH* 8,2.

Wśród włoskowców różycy istnieją szczepy zdolne i niezdolne do wytwarzania hialuronidazy adaptacyjnej niezależnie od tego czy w swej istocie są one hialuronidazododatnie czy ujemne. Zjawisko to daje się obserwować zarówno przy badaniach *in vivo* i *in vitro*.

Nie spostrzega się korelacji między adaptacyjnym wytwarzaniem hialuronidazy *in vivo*, a potęgowaniem zjadliwości szczepu.

Hialuronidaza zawarta w przesączu hodowli, przechowywana w temperaturze pokojowej w ciemni, nie zmienia swej aktywności w ciągu przynajmniej $1^1/_2$ roku. Hialuronidaza włoskowca różycy jest enzymem termolabilnym, ulega unieczynnieniu po 10-minutowym ogrzewaniu w temperaturze 47,5°.

LITERATURA

Ber A., Dryżek-Mikołajczyk Z., Mikołajczyk H., 1958: Badania nad układem hialuronidaza-kwas hialuronowy. Doniesienie 4. Wpływ kwasu hialuronowego na typ wzrostu hodowli bulionowych niektórych szczepów gronkowca *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **10**: 477.

Decowski M., Sozański T., 1958: Wytwarzanie hialuronidazy przez włoskowiec różycy. I. Występowanie. *Acta Microbiol. Polon.*, **7**: 201.

Dorfman A., Ott M. K., 1948: Turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. *J. Biol. Chem.*, **172**: 367.

Freeman M. E., Anderson P., Oberg H., Dorfman A., 1949: Preparation of purified hyaluronidase from bovine testes. *J. Biol. Chem.*, **180**: 655.

Freeman M. E., Webster M. E., 1952: Stability of purified hyaluronidase. *Proc. Soc. Explt. Biol. Med.*, **79**: 111.

Gibian H., 1954: Das Hyaluronsaüre-Hyaluronidase System. *Ergebn. Enzymforschung*, **13**: 1.

Hale E. W., 1944: Studies on diffusing factors. The influence of some environmental conditions on the activity of hyaluronidase. *Bioch. J.*, **38**: 368.

Mc Clean D., Halle C. W., 1941: Studies on diffusing factors of the hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrates and other agents that increase tissue permeability. *Bioch. J.* (London), **35**: 159.

Meyer K., Rapport M. M., 1952: Hyaluronidases. *Adv. Enzymol.*, **13**: 199.
Rogers H. J., 1945: The condition controlling the production of hyaluronidase by microorganism grown in simplified media. *Bioch. J.* (London), **39**: 435.
Sellers K. C., 1949: The production of hyaluronidase by *Streptococcus agalactiae* (Lancefield's group B). *J. Comp. Path. Ther.*, **59**: 109.
Tolkdorf S. C., Mc Cready M. H., Mc Cullogh D. R., 1950: *In vitro* studies with hyaluronidase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **52**: 1024.
Zabłocki B., Rolicka, 1952: Zwiększenie wytwarzania enzymu hialuronidazy przez dodanie jego substratu do podłóż wzrostu gronkowców złocistych hemolizujących. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **4**: 329.

Marian Decowski

PRODUCTION OF HYALURONIDASE BY *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*. II. PROPERTIES OF THE ENZYME

Summary

Hyaluronidase titer was measured by modified ACRA method. Eight strains of *E. rhusiopathiae* were used for experiments. Optimal hydrogen ion concentration for the production of the enzyme was similar with the optimal *pH* for the growth (about 8,2). Two types of hyaluronidase producers were found among examined strains: the first-produced only the constitutive enzyme, the second type was stimulated to production of the greater amount of hyaluronidase by presence of hyaluronic acid. The enzyme synthesis could be induced *in vitro*, as well *in vivo* — in animal passages. No correlation was found between the ability for enzymic adaptation and the increase of virulence during animal passages.

Crude hyaluronidase in culture filtrates was shown to be exceptionally stable; it may be stored at room temperature in dark containers for one and a half year, without any sign of inactivation. Heating at 47,5°C for 10 minutes destroyed the activity of tested hyaluronidase.

Adres autora:
Author's address:

Doc. Dr Marian Decowski,
Instytut Weterynarii,
Puławy, Al. Partyzantów 55,
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 169—180

Edmund Strzelczyk

STUDIES ON THE INCIDENCE OF CERTAIN "NUTRITIONAL" AND PHYSIOLOGICAL GROUPS OF BACTERIA IN RHIZOSPHERE AND NONRHIZOSPHERE SOIL *

From the Department of Agricultural Microbiology, College of Agriculture, Lublin
Received 28 February 1961

Summary

The rhizosphere exerts a preferential effect on certain physiological and nutritional types of bacteria. This effect depends on the kind and age of plant and type of soil.

INTRODUCTION

It is now well established that soil in the immediate vicinity of plant roots harbours larger numbers of organisms than soil more distant from the roots. This has been shown in numerous papers dealing with the influence of plants on the development of bacteria, actinomycetes, fungi and other microorganisms (Katznelson *et al.*, 1948). There is also evidence that the rhizosphere microflora differs qualitatively from that in soil more distant from the roots (Lochhead a. Chase, 1943; Lochhead a. Rouatt, 1955; Katznelson, 1946; Katznelson *et al.*, 1956; Katznelson a. Rouatt, 1957; Krasilnikow, 1944; Wozniakowska, 1948; Strzelczyk, 1958).

These quantitative and qualitative effects on the rhizosphere microflora are influenced by various factors including the type of soil and age of the plant (Katznelson *et al.*, 1948). For example it has been demonstrated by Rovira (1956c) and by Rouatt (1959), that even in the initial stages of its development the plant root exerts a profound effect on the numbers and types of microorganisms in the soil around

* This work has been carried out at the Microbiology Research Institute, Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Ontario.

it. Undoubtedly one of the reasons for the greater development of microorganisms in the vicinity of roots are root excretions. The characteristic composition of these excretions from different kinds of plants probably exerts a selective action on the microbial flora of soil. Also, the interaction between different kinds of microorganisms living in this habitat may result in the stimulation or inhibition of various types.

Qualitative studies of soil microorganisms have usually been conducted by using various selective media which were suitable for the growth of a given physiological group. This method, however, is not suitable for the detailed investigation of a large population of microorganisms living in a given habitat. In Canada, Lochhead introduced a quantitative-qualitative method for separating bacteria into morphological and nutritional groups. The method consists of using a nonselective plating medium (soil extract agar) for isolation, following which the bacteria are grouped according to their nutritional requirements. Studies reported by Lochhead and co-workers (1943, 1947a, b, 1940) on "nutritional groups" of soil bacteria, have shown, that the rhizosphere harbours larger numbers of bacteria requiring amino acids for their maximum growth and also of those stimulated by amino acids. Organisms with simple nutritional requirements (group *B*) that is, those capable of maximum growth in the simpler medium, were preferentially increased in the rhizosphere as compared with the control soil. Katznelson *et al.* (1956) confirmed these observations and found in addition, that bacteria requiring for their maximum growth the presence of soil and yeast extracts were more abundant in non-rhizosphere than in rhizosphere soil. On the basis of investigations of the nutritional requirements of soil bacteria, it was shown also that a large number need for their growth konwn vitamins (Lochhead a. Burton 1953, 1956a, 1957). Studies conducted in the same laboratory by Katznelson *et al.* (1957, 1959) have also shown that the rhizosphere harbours bacteria that are physiologically more active than these from nonrhizosphere soil.

Papers of this type published mainly by Canadian scientists are of great importance for a better understanding of bacterial activities in soil and the complicated interrelationship among microorganisms in their natural environments. Changes occuring among individual „nutritional groups" in the root zone may be caused both by direct influence of the plant (root exudates) or by interactions between different groups of organisms. For example the increased incidence in the rhizosphere of bacteria requiring amino acids for maximum growth may be ascribed to the excretion of these compounds by the roots of growing plants (Katznelson *et al.*, 1955. Rovira, 1956a) and /or by the synthesis of amino acids by organisms with simple nutritional requirements which are

themselves normally increased in the rhizosphere (Lochhead, 1958).

Relatively little work has been done on substances which stimulate the growth of soil microorganisms and of organisms producing these substances. More attention has been paid to the phenomenon of antagonisms as an important factor influencing the balance of microorganisms in soil. However, it is possible that nutritional factors also exert a selective effect on the microbial communities of the soil. This has been emphasized recently by Lochhead (1958).

The purpose of the present work was to investigate the incidence of some „nutritional" and physiological groups of bacteria in the rhizosphere of cultivated plants at various stages of growth in two different soils.

Methods

Radish, wheat and onions were grown in the greenhouse in 9 inch pots in two different soils: Granby sandy loam (*pH* 7,0, organic matter content 5.0%), and Uplands sand (*pH* 5.0, organic matter content 1.2%) supplemented with 0.5% $CaCO_3$ (final *pH* 7.0).

Samples of rhizosphere and control soils were collected at three stages of growth: 21,70 and 100 days after seeding. Roots were shaken to dislodge adhering soil and samples were placed in sterile water in weighed bottles, and shaken vigorously for 5 minutes. After the dilutions had been prepared, the roots were removed and washed in a funnel. All wash water and dilutions with soil were collected, returned to the original weighed flasks and evaporated in an oven at 105°C. Thus all the soil in the rhizosphere sample except that used for the analytical manipulations was collected and weighed. The results were calculated on the basis of oven dry soil. Plate counts were made in quintuplicate and the dilution series for various physiological groups in triplicate. Soil extract agar was used for bacterial counts (Lochhead a. Burton 1956b). Following an incubation period of 14 days at 26°C all bacterial colonies on a plate or representative section were picked and sub-cultures made into soil extract semisolid agar (Lochhead, 1940) to serve as stock cultures for further study. For the physiological tests a basal medium composed of soil extract, inorganic salts, 0.5% glucose and 0.25% yeast extract and peptone was used. For the methylene blue reducing test, methylene blue was added to this medium to give a final concentration of 1 : 200 000. Acid and gas were determined with Durham tubes in the above medium containing bromcresol purple at a final concentration of 0.0008%. Ammonifying and denitrifying bacteria were studied in suitable media as indicated previously (Katznelson, 1946). Aerobic cellulose decomposing bacteria were cultured in Omeliansky's medium. All tubes were incubated at 26°C and examined at regular intervals. The soil extract semisolid cultures were used for the nutritional studies following the procedure of Lochhead a. Chase (1943), which involves growth response in the following media:

Medium *B* — basal medium
„ *A* — „ „ + amino acids
„ *G* — „ „ + growth factors
„ *YS* — „ „ + yeast and soil extracts

After 5 days' incubation at 26°C the growth response of each isolate was determined by assigning a turbidity value of 4 to the tube showing heaviest growth and rating the others relatively. A difference of not less than 2 points was considered significant.

RESULTS

Tables I—IV show the bacterial counts and the incidence of some physiological and nutritional groups of bacteria in the rhizosphere of the plants studied and in the root-free (control) soils.

Table I
Numbers of bacteria in rhizosphere and control soils

Kind of plant	Age of plant in days	Bacteria in millions per gram of oven dry soil					
		Granby sandy loam			Uplands sand		
		Control	Rhizosphere	R:C*	Control	Rhizosphere	R:C*
Radish	21	5.6	95.3	17.0	2.8	60.0	21.4
	70	8.7	322.6	37.0	2.0	87.4	43.2
	100	9.4	142.9	15.2	1.4	44.7	31.9
Onion	21	5.6	21.2	3.7	2.8	16.3	5.8
	70	8.7	256.4	29.4	2.0	94.6	47.3
	100	9.4	587.6	62.5	1.4	117.0	83.5
Wheat	21	5.6	158.3	28.2	2.8	38.0	13.5
	70	8.7	109.2	12.5	2.0	32.9	16.9

* $R:C = \frac{\text{Numbers in rhizosphere soil.}}{\text{Numbers in control soil.}}$

Bacterial counts

It may be noted that the numbers of bacteria in the rhizosphere varried according to the kind of plant and its stage of growth. Numbers in the control soils varied with the type of soil, being greater in the fertile soil (Granby sandy loam). Hovewer, a greater rhizosphere effect was observed with the sandy soil (Uplands sand) than with soil that was higher in organic matter content. Radish and onion exerted a greater influence on the bacterial population in the former soil than did wheat; in Granby sandy loam the results are not so distinct. Nevertheless it can be seen in tab. I that wheat and radish harboured larger numbers of bacteria (as shown by the R : C ratios) in very early stages of their growth, in both soils, whereas onion was more effective in later stages.

Nutritional groups

The results of the nutritional studies with the bacterial isolates are given in tab. II.

Table II

Incidence of certain „nutritional" groups of bacteria in rhizosphere and control soils

Kind of plant	Age of plant in days	"Nutritional„ groups of bacteria in percent															
		Granby sandy loam								Uplands sand							
		Control				Rhizosphere				Control				Rhizosphere			
		B	A	G	YS	B	A	G	YS	B	A	G	YS	B	A	G	YS
Radish	21	7	26	11	56	21	39	10	30	13	19	8	60	17	46	7	30
	70	12	23	15	50	13	46	11	30	15	20	15	50	18	45	11	26
	100	6	23	18	53	18	38	12	32	15	21	13	51	14	41	12	33
Onion	21	7	26	11	56	24	35	12	29	13	19	8	60	16	42	2	40
	70	12	23	15	50	27	35	13	25	15	20	15	50	20	47	11	22
	100	6	23	18	53	10	52	13	25	15	21	13	51	18	38	14	30
Wheat	21	7	26	11	56	16	43	7	34	13	19	8	60	12	51	12	25
	70	12	23	15	50	19	42	9	30	15	20	15	50	18	47	15	20

Remarks: 1. B — Bacteria showing maximum growth in basal medium
2. A — „ „ „ „ „ „ „ + amino acids
3. G — „ „ „ „ „ „ „ + growth factors
4. YS — „ „ „ „ „ „ „ + yeast and soil extract

A comparison of the two soils shows a somewhat higher incidence of "*B*-group" bacteria in the poor soil (Uplands sand) and of "*A*-group" organisms in the fertile soil (Granby sandy loam). The roots in the latter soil also appeared to be more favourable for the "*B*-group", an effect which was not so strong with the rhizosphere isolates from the Uplands sand. Bacteria requiring amino acids for maximum growth ("*A*-group") were distinctly more numerous in the rhizosphere of plants from both soils than in the corresponding root-free soils. This effect appeared to be independent of the kind of plant and of the type of soil. It would seem, therefore, that the development of almost one-half of the rhizosphere bacteria was dependent upon the presence of amino acids in this zone. The data for the vitamin group (*G*) is not clear cut although there is a suggestion, that there are more of this type of organisms in the Granby sandy loam than in the corresponding rhizosphere soils. Root free soil in every case supported larger numbers of organisms requiring unknown substances in yeast and soil extract for maximum growth. Surprisingly the type and age of plant did not exert a noticeable effect on the percentage incidence of any of the nutritional groups studied.

Physiological groups

The data presented in Tab. III and IV show the effect of plants on the incidence of different physiological groups in rhizosphere and control soils. It would appear that the rhizosphere effect on these types of orga-

nisms depends on both, the kind of plant and stage of growth as well as on the type of soil.

Table III

Incidence of certain physiological groups of soil bacteria in control soil and in rhizosphere of plants growing in Granby sandy loam *

Age of plant in days	Physiological types	Control	Rhizosphere					
			Radish	R:C**	Onion	R:C	Wheat	R:C
21	1. Reducing methylene blue	2.7	79.1	29.2	12.5	4.6	112.5	41.6
	2. Producing acid from glucose	1.1	6.2	5.6	20.8	18.9	34.6	31.4
	3. Producing gas from glucose	0.02	1.2	60.0	1.2	60.0	2.2	110.0
	4. Ammonifying	6.2	208.3	33.6	125.5	20.2	346.1	55.8
	5. Denitrifying	2.7	20.8	7.7	12.5	4.6	7.3	2.7
	6. Cellulose decomposing	0.003	0.08	26.6	0.002	0.6	0.07	23.3
70	1. Reducing methylene blue	9.0	108.7	12.0	108.7	12.0	39.7	4.4
	2. Producing acid from glucose	2.4	4.1	1.7	413.0	172.0	23.8	9.9
	3. Producing gas from glucose	0.05	1.9	38.0	0.9	180.0	3.1	62.0
	4. Ammonifying	5.0	413.1	82.6	195.6	39.1	238.0	47.6
	5. Denitrifying	3.0	19.6	6.5	19.6	6.5	23.8	7.9
	6. Cellulose decomposing	0.01	0.1	10.0	0.1	10.0	0.01	1.0
100	1. Reducing methylene blue	1.8	47.5	26.3	346.1	192.2		
	2. Producing acid from glucose	2.4	7.5	3.1	215.4	89.7		
	3. Producing gas from glucose	0.01	0.32	32.0	0.2	20.0		
	4. Ammonifying	5.0	225.0	45.0	577.0	115.4		
	5. Denitrifying	0.5	22.5	45.0	7.3	14.6		
	6. Cellulose decomposing	0.001	0.02	20.0	0.07	70.0		

* Expressed in millions per gram oven dry soil. Calculations based on most probable numbers.

** $R : C = \frac{\text{Numbers in rhizosphere soil.}}{\text{Numbers in control soil.}}$

The numbers of methylene-blue reducing organisms were higher in the rhizosphere of younger wheat and radish than of older plants. Radish and wheat grown in Granby sandy loam had a lower R : C ratio than

plants in Uplands sand. Onion showed a striking increase in rhizosphere effect with these organisms with time, and especially in the later stages of its development regardless of soil type.

Table IV

Incidence of certain physiological groups of soil bacteria in control soil and in rhizosphere of plants growing in Uplands sand.

Age of plant in days	Physiological types	Control	Rhizosphere					
			Radish	R : C **	Onion	R : C	Wheat	R : C
21	1. Reducing methylene blue	1.6	173.0	108.1	8.8	5.5	132.4	82.7
	2. Producing acid from glucose	2.1	7.6	3.6	11.8	5.6	44.1	21.0
	3. Producing gas from glucose	0.005	0.06	12.0	0.1	20.0	0.4	80.0
	4. Ammonifying	5.5	365.3	66.4	153.0	27.8	145.1	26.3
	5. Denitrifying	0.3	28.8	96.0	15.3	51.0	14.5	48.3
	6. Cellulose decomposing	0.0005	0.04	80.0	0.002	4.0	0.03	60.0
70	1. Reducing methylene blue	0.9	26.7	29.6	13.2	14.6	70.4	78.2
	2. Producing acid from glucose	0.5	5.3	10.6	33.2	66.4	2.2	4.4
	3. Producing gas from glucose	0.05	0.5	10.0	0.5	10.0	2.1	42.0
	4. Ammonifying	1.1	339.2	308.3	131.6	119,6	35.7	32.4
	5. Denitrifying	0.5	33.9	67.8	5.0	10,0	2.8	5.6
	6. Cellulose decomposing	0.0005	0.009	18.0	0.005	10.0	0.006	12.0
100	1. Reducing methylene blue	1.0	13.4	13.4	180.0	180.0		
	2. Producing acid from glucose	1.0	8.0	8.0	160.0	160.0		
	3. Producing gas from glucose	0.002	0.01	5.0	0.03	15.0		
	4. Ammonifying	1.0	17.0	17.0	238.0	238.0		
	5. Denitrifying	0.3	17.0	56.6	6.8	22.6		
	6. Cellulose decomposing	0.001	0.02	20.0	0.02	20.0		

** — See footnote Table III.

Organisms producing gas from glucose appeared to be especially numerous in the rhizosphere of wheat in its early stage of growth (R : C = = 80 — 110 : 1). Studies carried out after 21 days of growth indicated a large number of these bacteria in the rhizosphere of onion grown in Granby sandy loam (R : C = 60 : 1). On the other hand the same plant grown in Uplands sand harboured less of these organisms (R : C = 20 : 1).

In general it appears that the more fertile soil seems to be more favourable for these organisms than the poorer Uplands sand.

Organisms producing acid from glucose were most numerous in the rhizosphere of onion in the later stages of its growth (70 and 100 days old plants). A much smaller number of these organisms was found in the rhizosphere of wheat and especially in that of radish (tab. III and IV). The effect of soil type was not clear.

Ammonifying bacteria appeared to be most numerous in the rhizosphere of 21 and 70 days old plants. The only exception occured with onion in both soils; this plant showed the greatest rhizosphere effect at the 100th day. Again the influence of the soil factor was not obvious.

The rhizosphere effect on denitrifying bacteria in comparison with the other physiological groups was less pronounced for wheat and onion, but greater for radish especially that grown in Uplands sand. In general the roots of plants in this soil seemed to favour these organisms. Twenty-one and 70 days old onion grown in Granby sandy loam showed only a small effect on these bacteria. The findings are in agreement with the results obtained by Timonin and Thexton (1950) who noted a stimulating action of onion and garlic on different groups of bacteria with the exception of denitrifying types.

Soil type had a strong influence on the rhizosphere effect of the crops on cellulose decomposing bacteria. It is of interest that 21 days old onions grown in Granby sandy loam inhibited somewhat numbers of these bacteria in rhizosphere soil. On the other hand the same plant grown in the same soil stimulated the development of these organisms in later stages of its growth. With the exception of 100 days old onions in Granby sandy loam, numbers of cellulose decomposing bacteria were higher in the rhizosphere of plants cultivated in Uplands sand. Katznelson (1946) working with mangles reported more cellulose decomposing bacteria in the rhizosphere of plants grown in unfertilized soil than in soil receiving farmyard manure.

DISCUSSION

The data on bacterial numbers presented in Table I are in agreement with the generally accepted view, that the rhizosphere harbours larger numbers of bacteria than non-rhizosphere soil.

The nutritional studies indicate that the plant influences the development of individual „nutritional" groups of bacteria independent of the type of soil. For example in the rhizosphere of all three plants grown in both soils, bacteria with simplest nutritional requirements and these requiring for maximum growth the presence of amino acids were always

more numerous than in soil more distant from the roots. Also, organisms of *G* and *YS* groups regardless of the type of soil, were more numerous in non-rhizosphere than in the rhizosphere soils. The occurence of a high percentage of amino acid requiring bacteria in the rhizosphere may be ascribed to the excretion of these compounds by the roots of growing plants and to the synthesis of amino acids by organisms having simpler nutritional requirements, which are also more numerous in rhizosphere than nonrhizosphere soil (Lochhead and Thexton, 1947a). The presence of amino acids in root excretions has been shown by Virtanen a. Laine (1939), Katznelson *et al.* (1955), Rovira (1956a). Payne, Rouatt and Lochhead (1957) reported, that 22 of 30 representative soil bacteria having simple nutritional requirements were able to synthesize a variety of amino acids. The culture filtrates of these bacteria permitted the growth of amino acids requiring bacteria. These findings indicate an associative action between the two nutritional groups of soil organisms, and suggest that the preferential stimulation in the rhizosphere of bacteria requiring amino acids may be ascribed in part to the synthesis of amino acids by bacteria with simple nutritional requirements.

On the basis of results obtained by different workers and the present results it becomes clear that the rhizosphere is a unique environment exerting on many groups and species of soil organisms a powerful selective action which varies with the kind and age of plant and the type of soil in which they grow. The soil itself may exert its influence directly on the organisms in the soil or rhizosphere or indirectly by stimulating or retarding plant growth, which in turn may influence the quantity and quality of root excretions available to the microorganisms in the rhizosphere. Inter-relationship of different kinds and groups of microorganisms as well as the action of root excretions seem to influence the balance of the microbial populations in the rhizosphere.

It has been shown by Lochhead (1940), Rovira (1956b, c), Rouatt a. Katznelson (1957) and Katznelson a. Rouatt (1957), that the rhizosphere harbours more active and more rapidly growing bacteria than non-rhizosphere soil. This active bacterial population may play an important role in plant nutrition and its well-being. However, much remains to be done in rhizosphere research if a better understanding of the complex inter-relationships between microorganisms, and between microorganisms and the plant in this habitat is to be achieved Such studies are of great interest both academically and practically, since the rhizosphere may exert a profound influence on the growth of the plant by affecting it nutrient supply and by favouring or inhibiting the development of root pothogenes in this zone.

FINAL CONCLUSIONS

On the basis of results obtained in this work, the following final conclusions may be drown:

1) The numbers of bacteria were always greater in rhizosphere than in non-rhizosphere soil.

2) Bacterial count varried according to the kind of plant, its stage of growth and type of soil.

3) Among the „nutritional groups" of rhizosphere bacteria, those having the simplest nutritional requirements (group *B*) and those requiring amino acids for maximum growth (group *A*) were always more abundant in the rhizosphere soil than in non-rhizosphere soil regardless the type of soil. On the other hand bacteria belonging to group *G* and *YS* were more numerous in non-rhizosphere soil.

4) The rhizosphere exerts a preferential effect on certain physiological types of soil organisms. This effect depends on the kind and age of plant and type of soil.

5) Generally the rhizosphere effect was greater in sandy soil than in heavier one.

ACKNOWLEDGMENT

The author wishes to express his gratitude to Dr H. Katznelson, Director, Microbiology Research Institute, Canada Department of Agriculture, Ottawa, for helpful advice and encouragment throughout the course of this work and for provision of facilities for this work. Thanks are also due to Dr J. W. Rouatt, Head of the Rhizosphere Section for his very valuable help. The author is indebted to the Rockefeller Foundation for granting him a fellowship which made this research possible.

LITERATURE

Katznelson H., Lochhead A. G., Timonin M. J., 1948: Soil microorganisms and the rhizosphere. *Bot. Rev.*, **14**: 543.

Katznelson H., Rouatt J. W., Payne T. M. B., 1956: Recent studies on the microflora of the rhizosphere. *VI-e Congres Int. Sci. du Sol.* Paris., **25**: 151.

Katznelson H., Rouatt J. W., Payne T. M. B., 1955: The liberation of amino acids and reducing compounds by plant roots. *Plant a. Soil*, **7**: 35.

Katznelson H., 1946: The „rhizosphere effect" of mangles on certain groups of soil microorganisms. *Soil Sci.*, **5**: 343.

Katznelson H., Rouatt J. W., 1957: Studies on the incidence of certain physiological groups of bacteria in the rhizosphere. *Can. J. Microbiol.*, **3**: 265.

Katznelson H., Bose B., 1959: Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere and nonrhizosphere soil. *Can. J. Microbiol.*, **5**: 79.

Krasilnikow N. A., 1944: Wlijanije rastitielnowo pokrowa na mikrobnyj sostaw w poczwie. *Mikrobiologia*, **13**: 187.

Lochhead A. G., Chase F. E., 1943: Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. *Soil Sci.*, **55**: 185.

Lochhead A. G., Rouatt J. W., 1955: The „rhizosphere effect" on the nutritional groups of soil bacteria. *Soil Sci. Amer. Proc.*, **19**: 48.

Lochhead A. G., Burton M. O., 1953: An essential bacterial growth factor produced by microbial synthesis. *Can. J. Bot.*, **31**: 7.

Lochhead A. G., Burton M. O., 1956a: Soil as a habitat of vitamin requiring bacteria. *Nature*, **178**: 144.

Lochhead A. G., Thexton R. H., 1947a: Qualitative studies of soil microorganisms. VII. The „rhizosphere effect" in relation to the amino acid nutrition of bacteria. *Can. J. Res. C.*, **25**: 20.

Lochhead A. G., Burton M. O., 1957: Qualitative studies of soil microorganisms. XIV. Specific vitamin requirements of the predominant bacterial flora. *Can. J. Microbiol.*, **3**: 35.

Lochhead A. G., 1958: The soil microflora, the plant and the root pathogen. *Trans. Roy. Soc. Canada.* Third Serie. Vol. L II Section V.

Lochhead A. G., Burton M. O., 1956b: Importance of soil extract for the enumeration and study of soil bacteria. *VI-e Congr. Int. Sci. du Sol. Paris.*, **26**: 157.

Lochhead A. G., 1947b: The bacterial equilibrium in soil with special reference to plant growth. *Abstracts IV Int. Congress Microbiol.* Copenhagen.

Lochhead A. G., 1940: Qualitative studies of soil microorganisms III. Influence of plant growth on the character of the bacterial flora. *Can. J. Res.*, **18**: 42.

Payne T. M. B., Rouatt J. W., Lochhead A. G., 1957: The relationship between soil bacteria with simple nutritional requirements and those requiring amino acids. *Can. J. Microbiol.*, **3**: 73.

Rouatt J. W., 1959: Initiation of the rhizosphere effect. *Can. J. Microbiol.*, **5**: 67.

Rouatt J. W., Katznelson H., 1957: The comparative growth of bacterial isolates from rhizosphere and nonrhizosphere soils. *Can. J. Microbiol.*, **3**: 271.

Rovira A. D., 1956a: Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. *Plant a. Soil*, **7**: 178.

Rovira A. D., 1956b: Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. II. A study of the properties of root exudate and its effect on the growth of microorganisms isolated from the rhizosphere and control soil. *Plant a. Soil*. **7**: 195.

Rovira A. D., 1956c: A study of the development of root surface microflora during the initial stages of plant growth. *J. Appl. Bact.*, **19**: 72.

Strzelczyk E., 1958: Wpływ różnych roślin uprawnych na liczebność azotobaktera i *Clostridium* w ich rizosferze. *Acta Microbiol. Polon.*, **7**: 115.

Timonin M. J., Thexton R. H., 1950: The rhizosphere effect of onion and garlic on soil microflora. *Soil Sci. Americ. Proc.*, **15**: 186.

Virtanen A. J., Laine T., 1939: Investigations on the root nodula bacteria of leguminous plants. XXII. The excretion products of root nodules. *Biochem. J.*, **33**: 412.

West P. M., Lochhead A. G., 1940: The nutritional requirements of soil bacteria — a basis for determinating the bacterial equilibrium in soils. *Soil. Sci.*, **50**: 409.

Woźniakowska J. M., 1948: Wlijanije korniewoj sistiemy pszenicy na mikrofloru poczwy. *Mikrobiologia*. **17**: 458.

Edmund Strzelczyk

BADANIA NAD WYSTĘPOWANIEM NIEKTÓRYCH GRUP „POKARMOWYCH" I FIZJOLOGICZNYCH BAKTERII W RIZOSFERZE I W GLEBIE POZA KORZENIAMI

Streszczenie

Przeprowadzono badania nad występowaniem niektórych grup „pokarmowych" i fizjologicznych bakterii w rizosferze 3 roślin (rzodkiewka, pszenica i cebula), uprawianych w 2 różnych glebach: w żyznej glebie glinkowatej i ubogim piasku.

Stwierdzono występowanie znacznie większych ilości bakterii o prostych wymaganiach pokarmowych (grupa *B* według podziału Lochheada) oraz bakterii rozwijających się najlepiej w obecności aminokwasów (grupa *A*) w rizosferze, niż w samej glebie. Zjawisko to obserwowano w obu typach gleb. Nie notowano specjalnego gromadzenia się w rizosferze bakterii wymagających do swego rozwoju lub stymulowanych obecnością substancji wzrostowych (grupa *G*). Natomiast organizmy rozwijające się najlepiej w obecności wyciągu drożdżowego i glebowego występowały zawsze liczniej poza korzeniami roślin niż w rizosferze. Typ gleby i stadium rozwoju rośliny nie wpływały na zmiany składu procentowego poszczególnych grup pokarmowych wśród bakterii rizosfery.

Wyniki badań nad występowaniem grup fizjologicznych bakterii w rizosferze wykazały zależność występowania różnych ich typów od gatunku rośliny, jej stadium rozwojowego i rodzaju gleby. We wszystkich wypadkach rizosfera była zawsze siedliskiem bardziej sprzyjającym rozwojowi badanych grup fizjologicznych bakterii niż gleba oddalona od korzeni.

Author's address:
Adres autora:

Mgr Edmund Strzelczyk,
Zakład Mikrobiologii Rolniczej WSR,
Lublin, ul. Króla Leszczyńskiego 9.
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 181—185

Stanisław Kołaczkowski, Janina Kowalczyk,
Zbigniew Piotrowski i *Zbigniew Żukowski*

CHLOROWANIE ŚCIEKÓW W SANATORIACH PRZECIWGRUŹLICZYCH

II. SKUTECZNOŚĆ CHLOROWANIA ŚCIEKÓW

Z Laboratorium Kolejowej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Poznaniu, Laboratorium przy Sanatorium Przeciwgruźliczym w Chodzieży i Zakładu Badawczego Techniki Sanitarnej IGK w Poznaniu

Wpłynęło dnia 29 czerwca 1960 r.

Streszczenie

Opisano metodę chlorowania ścieków sanatoriów przeciwgruźliczych, zapewniającą pełne usunięcie prątków. Jednocześnie określono minimalne stężenie i czas działania chloru.

WSTĘP

W poprzedniej pracy (Kołaczkowski i współpracownicy 1959) wykazano, że prątki gruźlicy typu ludzkiego tracą swą żywotność pod wpływem chloru, jeśli zachowuje się pewne warunki procesu chlorowania, a mianowicie odpowiednie stężenie chloru i czas jego kontaktu z bakteriami.

Dla zawiesin prątków w wodzie całkowitą skuteczność chlorowania osiągano przy $t \cdot c \geqslant 1200$, gdzie t — czas kontaktu w minutach, c — stężenie chloru pozostałego po czasie t, przy pH 7,0—7.5, temperaturze 20° i dla zakresu: $t = 30$ — 150 minut, $c = 8{,}0$ — 40 mg Cl_2/l.

Powyższe wyniki, jakkolwiek dokładnie określały tzw. iloczyn toksyczności chloru dla prątków, nie mogły jednak stanowić podstawy do budowy urządzeń służących skutecznej dezynfekcji ścieków z uwagi na dużą przeżywalność prątków w naturalnych warunkach wodnych czy glebowych.

Z tego powodu podjęto niniejszą pracę w celu sprawdzenia czy i dla ścieków z sanatoriów przeciwgruźliczych podane wyżej warunki gwarantują pełną skuteczność chlorowania.

METODA BADAŃ

Do badań użyto średniodobowej próby ścieków z sanatorium przeciwgruźliczego o 300 łóżkach. Ścieki pobierano po przejściu ich przez osadnik fermentacyjny (czas przepływu około 10 godzin). W próbie oznaczono temperaturę, *pH*, utlenialność i BZT_5 wg ujednostajnionych metod stosowanych w badaniu wody (Just i Hermanowicz 1955, Standard Methods 1955). W celu wykazania skuteczności procesu chlorowania ścieków, prowadzono badanie nad przeżywalnością prątków w ściekach oczyszczonych mechanicznie oraz w ściekach chlorowanych różnymi dawkami chloru i przy różnym czasie kontaktu, z zachowaniem ustalonego poprzednio iloczynu śmiertelności ($t : c \geqq 1200$). Stosowano czas kontaktu równy 45, 60, 90 i 120 minut, po czym przerywano działanie chloru dodając obliczoną dawkę 0,025 N $Na_2S_2O_3$.

W celu przygotowania materiału do posiewów, ścieki poddawano wirowaniu przy 3500 obrotach na minutę przez okres 30 minut. Odwirowany osad dzielono na dwie części, z których jedną poddawano tzw. homogenizacji fosforanowej (Buraczewska i współpracownicy 1957), a drugą homogenizacji metodą Petroffa (Jensen 1957). Przed wykonaniem posiewów sprawdzano mikroskopowo obecność prątków kwaso-alkoholoopornych. Osady homogenizowane powyższymi metodami posiewano na pożywki stałe Löwensteina — Jensena (Jensen 1948, 1954, 1957) bez preparatów przeciwprątkowych oraz z ich dodatkiem. Pożywki Löwensteina-Jensena z dodatkiem preparatów przeciwprątkowych przygotowano w trzech odmianach (Warssam 1956):

1. z 10 μg/ml hydrazydu kwasu izonikotynowego (INH)
2. z 50 μg/ml streptomycyny (SM)
3. z 50 μg/ml PAS.

Wszystkie pożywki zawierały w 1 ml 100 jednostek penicyliny, a to w celu uniemożliwienia ewentualnego zakażenia florą towarzyszącą. Okres inkubacji trwał do trzech miesięcy w temperaturze 37°. Kontrolę hodowli przeprowadzano przez pierwsze trzy dni codziennie, a następnie co tydzień. Żywotność i zjadliwość prątków sprawdzono próbami cytochemicznymi — próbą Dubos z czerwienią obojętną, próbą na katalazę i peroksydazę (Paraf, Desbardes 1953).

WYNIKI BADAŃ

W badanych ściekach stwierdzono:

temperaturę 23°
pH 7,5
utlenialność 69,0 mg O_2/l
BZT_5 201,0 mg O_2/l

Z odwirowanego ze ścieków osadu na preparatach bezpośrednich wykryto 1—10 prątków kwaso-alkoholoopornych co kilkanaście pól widzenia. Wyniki hodowli prątków w ściekach nie chlorowanych przedstawia tabela I:

Posiewy na pożywce Löwensteina-Jensena z dodatkiem preparatów przeciwprątkowych (IHN, SM i PAS) wykazały wzrost pojedynczych kolonii prątków.

Tabela I

Posiew na pożywkę Löwensteina-Jensena bez dodatku preparatów przeciwprątkowych. Występowanie prątków w ściekach nie chlorowanych

Cultures on Löwenstein-Jensen medium without anti-tuberculous substances. Occurence of tubercle bacilli in not chlorinated sewage

Materiał homogenizowany metodą: Methods of homogenisation:	Nr próby — Sample N°											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fosforanową	K +++	K ++	K +++	K ++	K ++	Ks	Ks	Ks	K +			
Petroffa	K +++	K ++	K ++	K ++	K +	K +	K	K	K +	K +	++	+

Objaśnienia:

Remarks:

\+ pojedyncze kolonie, single colonies
++ 5 — 10 kolonii, 5 — 10 colonies
+++ 10 — 20 kolonii, 10 — 20 colonies
K kontaminacja, contamination
Ks pożywka spłynęła, culture destroyed.

Preparaty mikroskopowe wykonane ze wszystkich posiewów wykazały typowe prątki gruźlicy. Przeprowadzone badania cytochemiczne z czerwienią obojętną wykazały w 70% zjadliwe i w 30% niezjadliwe prątki. Badania cytochemiczne na katalazę i peroksydazę wykazały prątki katalazo-mieszane i peroksydazo-mieszane.

Tabela II

Sposób chlorowania ścieków

Method of chlorination of sewage

mg Cl_2/1			Czas kontaktu w minutach Time of contact (minutes)
Dawka początkowa Initial	Stężenie końcowe Final	Zużycie Consumption	
58,6	33,30	25,20	45
49,92	24,81	25,11	60
39,00	13,80	25,20	90
42,90	10,28	32,62	120

Ścieki chlorowane wg tabeli II. posiewano na pożywkę Löwensteina Jensena stosując omówione metody. Dla każdej dawki chloru i dla każdego czasu kontaktu wykonano po 18 posiewów. We wszystkich wypadkach uzyskano wynik ujemny.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania wykazały, że w ściekach z sanatoriów przeciwgruźliczych można stwierdzić obecność żywych prątków stosunkowo prostymi metodami stosowanymi w bakteriologicznej diagnostyce gruźlicy ludzkiej. Żywe prątki występowały w ściekach, mimo stosowania w leczeniu pacjentów sanatorium preparatów przeciwprątkowych oraz mimo sterylizacji i częściowej dezynfekcji sprzętu i wydalin.

Obecność w ściekach zjadliwych prątków uodpornionych na działanie INH, SM i PAS stwarza ogromne niebezpieczeństwo dla ludzi i zwierząt korzystających z wody odbiornika ścieków.

Chlorowanie ścieków oczyszczonych wstępnie w osadniku wykazało słuszność warunków skutecznej dezynfekcji ścieków ustalonych w poprzedniej pracy dla zawiesiny prątków w wodzie. Uzyskano 100-procentową śmiertelność prątków w ściekach dla czasu kontaktu: $t = 45$, 60, 90 i 120 minut, przy końcowym stężeniu chloru odpowiednio: $c = 33{,}3$; 24,8; 13,8; 10,28 mg Cl_2/l, a więc w warunkach $t \cdot c \geqslant 1200$ w temperaturze 23°, przy *pH* 7,5.

Powyższe badania bakteriologiczne dają podstawę do technicznego rozwiązania problemu dezynfekcji ścieków z sanatoriów przeciwgruźliczych.

Szczegóły takich rozwiązań, zależne od wielu czynników lokalnych, jak na przykład rodzaju kanalizacji czy odbiornika ścieków, wymagają osobnych opracowań.

LITERATURA

Buraczewska M., Broda Z., Janowiec M., Paryski E., Żebrowski I., 1957: Bakteriologiczne metody diagnostyki gruźlicy; wyd. przez Komisję Mikrobiologiczną Rady Naukowej Instytutu Gruźlicy, Warszawa.

Jensen K. E., 1948: Undersgelser over Forekamst og Uskadeliggrelse of Vimlente Tuberkelbakterier i Spildevand. Kommis Hos. G. F. C. Gads Forlag. Copenhagen, Denmark.

Jensen K. A., 1954: Essai de standardisation des methodes de laboratoire. *Bull. Un. Int. contre Tuberc.*, **24**: 81.

Jensen K. A., 1957: Essai de standardisation des methodes de laboratoire. *Bull. Un. Int. contre Tuberc.*, **27**: 147.

Just J., Hermanowicz W., 1955: Fizyczne i chemiczne metody badania wody do picia i potrzeb gospodarczych. PZWL Warszawa.

Kołaczkowski S., Kowalczyk J., Żukowski Z., 1959: Chlorowanie ścieków w sanatoriach przeciwgruźliczych. Cz. I. Zależność przeżywalności prątków od stężenia chloru i czasu jego działania. *Acta Microbiol. Polon.*, **8**: 181.

Paraf, Desbardes. 1953: L'etude de la virulence de bacilles de Koch par les tests cytochimiques. *Rev. Tuberc.*, **7/8**: 849.

Warssam, 1956: Methods for determining the sensivity of *Mycobacterium* to INH, streptomycin and PAS. *Tubercle*, **2**: 73.
Standard Methods for the Examination of Water, Sewage and Industrial Wastes, New York 1955.

Stanisław Kołaczkowski, Janina Kowalczyk, Zbigniew Piotrowski and *Zbigniew Żukowski*

DESINFECTION OF SEWAGE OF ANTITUBERCULOUS SANATORIA WITH CHLORINE. PART II.

Summary

In the previous paper (Kołaczkowski et al. 1959) the effect of chlorination on the tubercle bacilli suspended in water was examined. Investigations have been then carried out to examine the suitability of this method for desinfection of sewage from antituberculous sanatoria.

The results have shown that: the examined sewage contained virulent tubercle bacilli, often streptomycine-, isoniacid- and PAS-resistant; 100 per cent of tubercle bacilli may be killed by chlorination of mechanically cleaned sewage in the conditions described by the formula $t \cdot c \geqq 1200$, where t = time of contact in minutes, c = chlorine concentration after the time t, in mg/l.

The above results may have practical application at designing new installations for sewage desinfection.

Adres autorów:
Authors' address:

doc. dr S. Kołaczkowski
Poznań, ul. Mostowa 14a/7
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 187—197

Jadwiga Jakubowska i *Helena Oberman*

WPŁYW *pH* I SKŁADNIKÓW PODŁOŻA NA PRZEMIANĘ GAZOWĄ I TWORZENIE ACETOINY PRZEZ *STREPTOCOCCUS DIACETILACTIS* *

Z Katedry Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej
Wpłynęło dnia 6 lipca 1960 r.

Streszczenie

Wykazano, że *Streptococcus diacetilactis* posiada dużą zdolność dekarboksylacji swoistych substratów, wykazując właściwości typowego metabolizmu anoksybiontycznego.

Streptococcus diacetilactis, wyodrębniony i opisany w Polsce (Matuszewski, Pijanowski, Supińska, 1936, 1937), uznany za typ heterofermentatywny, łączy cechy paciorkowców kwaszących typu *Str. lactis* i *Str. cremoris* i aromatyzujących typu *Str. citrovorus* i *Str. paracitrovorus*, wytwarzając w mleku do 0,9% prawoskrętnego kwasu mlekowego, oraz składniki aromatu masła: acetoinę i dwuacetyl. Poza tym powstają również drobne ilości kwasu octowego i CO_2.

Badania nad szczepami tego gatunku, prowadzone od 1945 r., wykazały zdolność do wzrostu i intensywnej produkcji acetoiny w hodowli na wodzie drożdżowej z dodatkiem glikozy i cytrynianu sodu. Przy wzrastających stężeniach tych składników, dodawanych w stosunku 1 : 2, proporcjonalnie wzrastała ilość acetoiny, której maksimum wynosiło 400 mg przy zawartości 2,5% glikozy i 5% cytrynianu sodu w podłożu (Supińska-Jakubowska 1948, 1952).

Tworzenie acetoiny i dwuacetylu przez *Str. diacetilactis* i inne szczepy, wchodzące w skład zakwasów mleczarskich, oraz wpływ *pH* i *Rh* omawia Maksimowa (1954).

* Praca stanowi fragment prowadzonych przez nas badań nad metabolizmem *Str. diacetilactis* częściowo subwencjonowanych przez Komitet Mikrobiologiczny PAN.

Wytwarzanie CO_2 przez *Str. diacetilactis* było również oznaczane przez Olivera (1952, 1953).

W zależności od potencjału oksydo-redukcyjnego, acetoina ulega bądź redukcji do 2,3-glikolu butylenowego, bądź utlenianiu do dwuacetylu. W środowiskach biologicznych system ten jest odwracalny.

Prace lat ostatnich nad mechanizmem powstawania acetoiny w różnych systemach biologicznych wskazują, że substratem dla tego kierunku biosyntezy mogą być różne związki. Większość autorów uważa za bezpośredniego prekursora acetoiny bądź aldehyd octowy, bądź kwas pirogronowy, które mogą podlegać odpowiednim przemianom. Harden i Norris a następnie Neuberg i Reinfurth tłumaczyli tworzenie acetoiny u drożdży reakcją kondensacji dwóch cząsteczek aldehydu octowego. Neuberg sugerował, że w drożdżach występują dwa odrębne enzymy, karboksylaza i karboligaza, warunkujące powstawanie aldehydu octowego i jego kondensację *in statu nascendi* do acetoiny. Silverman i Werkman (1941) nie potwierdzili jednak tej koncepcji. Inny schemat powstawania acetoiny u *Aerobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* i *Bacillus subtilis* udowodnił Juni (1952a, b). Według tego autora 2 cząsteczki kwasu pirogronowego ulegają kondensacji acyloinowej do kwasu α-acetylomlekowego. Ten z kolei pod wpływem specyficznej dekarboksylazy (enzym II) przechodzi w acetoinę i CO_2. Moat i Lichstein (1953) również stwierdzili dekarboksylację kwasu α-acetylomlekowego przez *Lactobacillus arabinosus* nr 17-5 przy *pH* 3 do 4, otrzymując z 1 mola tego związku: 1 mol · CO_2 i 1 mol acetoiny.

Krenn i Valik (1949) wykazali, że *Leuconostoc citrovorum* i *A. aerogenes* tworzą acetoinę bądź z kwasu pirogronowego, bądź z aldehydu octowego. Również Howells i Lindstrom (1958) stwierdzili, że wolny aldehyd octowy może być prekursorem acetoiny u *Bacillus cereus*.

W tkankach zwierzęcych i roślin wyższych acetoina może powstawać 3 drogami: 1. z kwasu pirogronowego, 2. z kwasu pirogronowego i aldehydu octowego, 3. z wolnego aldehydu octowego. Bieg tych reakcji w tkankach zwierzęcych udowodnili Green i współpracownicy (1941), Gross i Werkman (1947), a w tkankach roślinnych — Singer i Pensky (1952). Są także doniesienia mówiące o tym, że acetoina tworzy się w warunkach beztlenowych przy działaniu oksydazy pirogronowej zwierzęcej i bakteryjnej na kwas pirogronowy (Juni i Heym 1956).

Overby (1946), Bang Folke (1949), Pette (1949) i inni podkreślają, że kwas cytrynowy odgrywa zasadniczą rolę w mleku jako składnik wyjściowy dla syntezy związków „aromatu masła", wytwarzanych przez heterofermentatywne paciorkowce.

BADANIA WŁASNE

Zmierzając do wyświetlenia wpływu rodzaju substratów na przemianę gazową *Str. diacetilactis* badano metabolizm komórek spoczynkowych. Doświadczenia prowadzono konwencjonalną metodą manometryczną w aparacie Warburga, określając intensywność wydzielania CO_2 i pobierania tlenu.

Jednocześnie w części prób, po zakończeniu badania przemiany gazowej, kontrolowano obecność acetoiny testem Westerfelda (1945).

Do doświadczeń użyto szczepu Nr *115-a* naszej kolekcji. Szczep ten wyodrębniony i przebadany przez Supińską-Jakubowską w 1951 r. został wysuszony w próżni nad P_2O_5 i przechowywany w atmosferze azotu. Reaktywowano go w 1958 r. przy czym stwierdzono zachowanie cech typowych dla tego gatunku (Jakubowska i współpracownicy 1959).

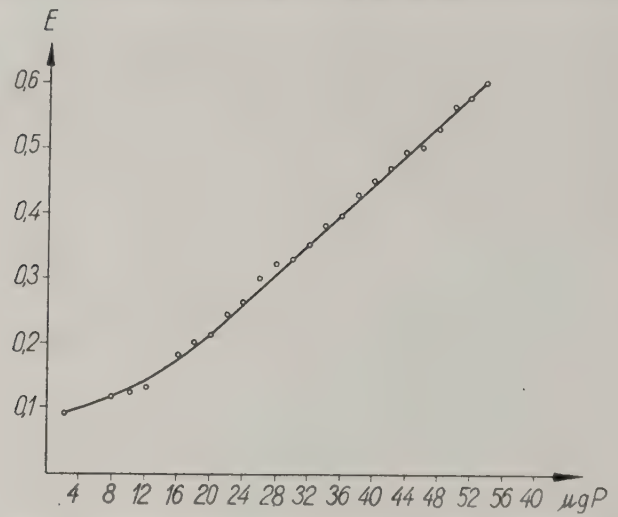
Podstawową zawiesinę do badań przygotowywano w sposób następujący: z hodowli na mleku kulturę wyjściową przeszczepiano na pożywkę płynną, składającą się z wody drożdżowej z 0,5% glikozy. Po 24 godzinach hodowli w 30° zawiesinę komórek wysiewano w ilości 1 do 1,5 ml na powierzchnię pożywek stałych o składzie: woda drożdżowa + 1% glikozy + 2% cytrynianu sodu, rozlanych do kolb Kollego. Po 40-godzinnej hodowli w 30° bakterie zmywano z powierzchni pożywki sterylną wodą destylowaną i sączono przez sączek porcelanowy G_3 dla otrzymania jednorodnej zawiesiny. Zawiesinę komórek czterokrotnie wirowano przy 3 500 obr./min. przez 15 minut, każdorazowo przemywając je wodą, a następnie zawieszano je w odpowiedniej ilości wody, buforu fosforanowego albo cytrynianowego. W ten sposób otrzymywano z 1 kolby Kollego 6—8 ml podstawowej zawiesiny bakterii o zawartości 200 do 500 mg fosforu bakteryjnego w 1 ml. Zgodnie z sugestią Bennetta i Williamsa (1957) jako wskaźnik ilości masy komórkowej w zawiesinach przyjęto zawartość fosforu.

Fosfor oznaczano metodą Fiske-Subbarow. Ilość fosforu w suchej masie komórek *Str. diacetilactis* wynosiła średnio 1.7%. Suchą masę oznaczano metodą wagową w 10 ml zawiesiny podstawowej, w 2 powtórzeniach, susząc początkowo w 60°, a następnie w 105°, do uzyskania stałej wagi. Oznaczenia te przeprowadzone dla 10 zawiesin, w których określano zawartość fosforu, a jednocześnie stopień ekstynkcji w kolorymetrze Pulfricha przy filtrze S_{66}. Na tej podstawie wyprowadzono krzywą standardową przedstawioną na wykresie 1, na którym podane punkty reprezentują uzyskane średnie wyniki. Dla odczytywania ilości fosforu w zawiesinie na podstawie odczytów mętności względnej w nefelometrze Pulfricha przy płytce nr 4, wyprowadzono prostą (wykres 2). Linia prosta ciągła przedstawia tę współzależność, linie przerywane — granice wahań, w których zawarte są punkty empiryczne, ustalone na podstawie oznaczeń wykonanych w 10 zawiesinach, przy czym dla każdej wykonano 4—8 oznaczeń.

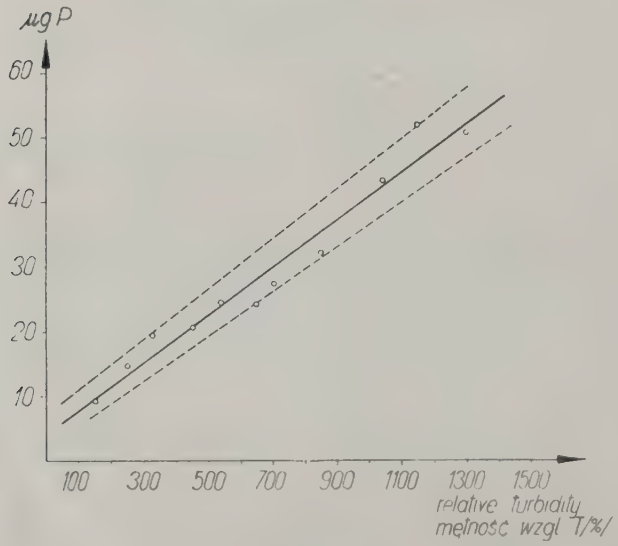
Właściwe badania metodą Warburga przeprowadzano następująco:

Do naczyńka reakcyjnego wnoszono 2 ml zawiesiny podstawowej oraz 2 ml substratu o odpowiednim stężeniu. Pobieranie tlenu mierzono przy wprowadzeniu do centralnego pierścienia naczyniek 0.2 ml 10% roztworu KOH. Temperatura łaźni wynosiła 28°, częstotliwość wytrząsania około 120 wychyleń/min. Odczyty wykonywano co 30 minut w czasie 2 lub 3 godzin. Wyniki ustalono na podstawie trzech równolegle prowadzonych prób, przy odchyleniach nie przekraczających 3—5%.

Po zakończeniu doświadczeń manometrycznych sprawdzono jakościowo obecność acetoiny metodą Westerfelda.



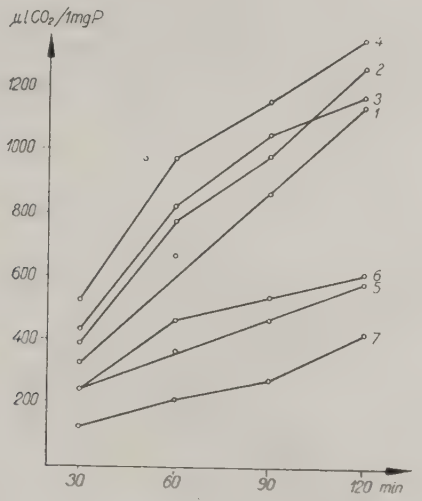
Rys. 1. Krzywa standardowa: zależność między ekstynkcją a zawartością fosforu bakteryjnego
Fig. 1. Standard curve: relationship between the extinction and P content in bacteria



Rys. 2. Zależność między ilością fosforu bakteryjnego a mętnością względną zawiesiny bakterii
Fig. 2. Relationship between the content of P and relative turbidity of bacterial suspension

WYNIKI I WNIOSKI

W próbach wstępnych badano wpływ podłoża, w którym zawieszano komórki na przemianę gazową, stosując porównawczo: wodę destylowaną, bufor fosforanowy o *pH* 6 i bufor cytrynianowy o *pH* 6. Substratem były różne stężenia glikozy, od 0,5 do 2,0%. Wyniki tych prób przedstawiono na wykresie 3.



Rys. 3. Wpływ środowiska, w którym zawieszono bakterie, na ich przemianę gazową

Fig. 3. Effect of the medium on the metabolism of bacteria (gaseous exchange)

1 — 0,5% glikozy
2 — 1,0% glikozy
3 — 1,5% glikozy
4 — 2,0% glikozy
5 — 1,0% glikozy + 2,0% cytrynianu sodu
bufor cytrynianowy, *pH* 6,0
— 0,5% glucose
— 1,0% glucose
— 1,5% glucose
— 2,0% glucose
— 1,0% glucose + 2,0% sodium citrate
citrate buffer, *pH* 6,0
6 — 1% glikozy + 2% cytrynianu sodu; bufor fosforanowy, *pH* 6,0
— 1% glucose + 2% sodium citrate, phosphate buffer, *pH* 6,0
7 — 1% glikozy + 2% cytrynianu sodu, woda destylowana
— 1% glucose + 2% sodium citrate, distilled water

Przemiana gazowa zachodziła intensywnie jedynie w buforze cytrynianowym, przy czym wzrastające stężenia glikozy nieznacznie tylko wzmagały intensywność wyzwalania CO_2.

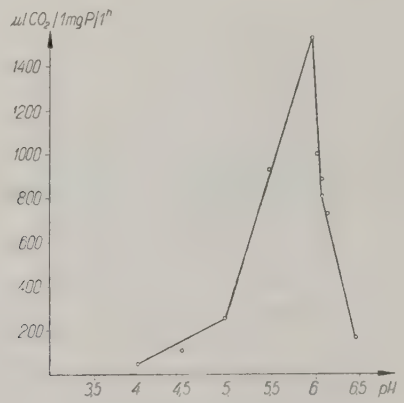
Dodatek 2% cytrynianu sodu do prób zawierających 1% glikozy spowodował przemianę we wszystkich 3 środowiskach, najintensywniejszą jednak w buforze fosforanowym. W buforze cytrynianowym otrzy-

mano o 30% niższą przemianę, co zdaje się wskazywać na hamujący wpływ wyższego stężenia tego związku i ewentualnie przesunięcie *pH*.

Najwyższą przemianę uzyskano wobec 2% glikozy: 1361 μl CO_2/1 mg P bakt./2 godz.

Wyniki nasze potwierdzają również dane Pimenowej (1957), która badała wzrost kilku szczepów *Str. diacetilactis* na różnych substratach, oraz Christensena i Pedersona (1958), którzy stwierdzili zmianę metabolizmu homo- i heterofermentatywnych pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*, zależnie od wartości *pH* i obecności cytrynianu.

W następnej serii prób ustalono wpływ *pH* na przemianę gazową. Zastosowano bufor fosforanowy o wartościach *pH* od 4,0 do 6,55, a jako substrat: 1% glikozy + 2% cytrynianu sodu.

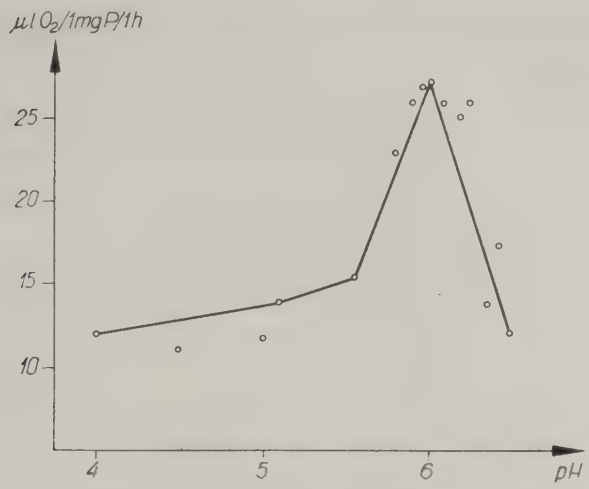


Rys. 4. Wpływ *pH* na wydzielanie CO_2 przez *Str. diacetilactis*; Substrat: 1% glikozy + 2% cytrynianu sodu

Fig. 4. Effect of *pH* on CO_2 production by *Str. diacetilactis*; Substrate: 1% glucose + 2% sodium citrate

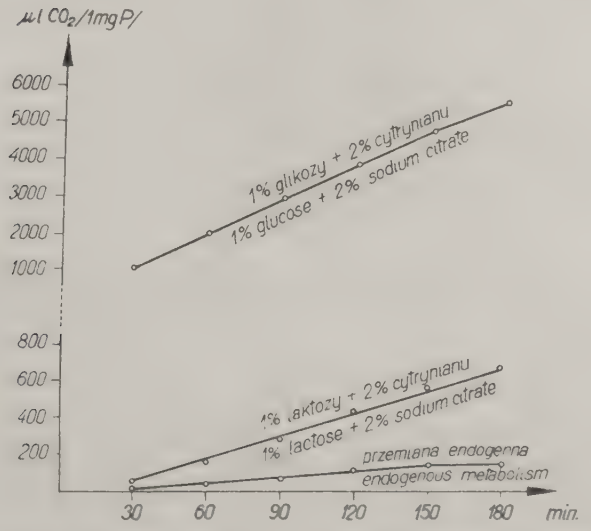
Wyniki przedstawiono na wykresach 4 i 5. Maksymalna przemiana gazowa zachodziła przy *pH* 5,98—6,05: 1561 μl CO_2/1 mg P bakt./1 godz., oraz 28 μl O_2/1 mg P/1 godz. Ten charakter przemiany potwierdza właściwości *Str. diacetilactis* jako typowego mikroaerofila o metaboliźmie anoksybiontycznym (anoxybiontic wg Mc Bee i współpr. 1955), uzdolnionego do intensywnej dekarboksylacji zastosowanych substratów.

Dalsze próby prowadzono w buforze fosforanowym o *pH* 5,9—6,0, stosując jako substrat glikozę, kwas cytrynowy i cytrynian sodu. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 1 oraz na wykresach 6, 7.



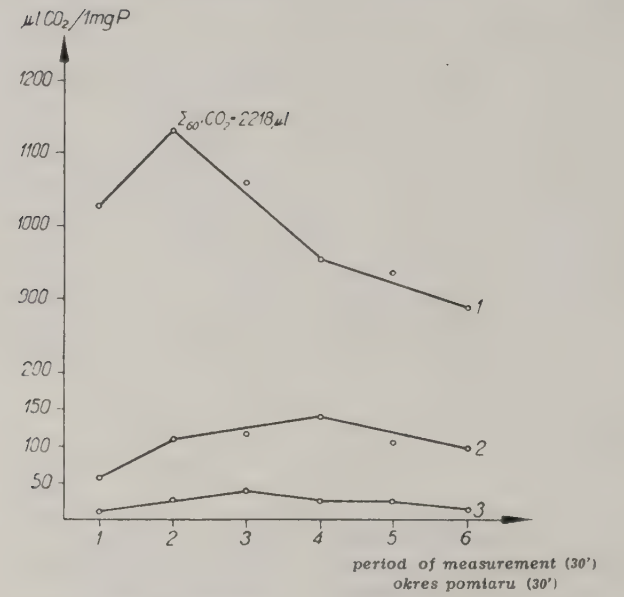
Rys. 5. Wpływ *pH* na pobieranie O_2 przez *Str. diacetilactis*. Substrat: 1% glikozy + 2% cytrynianu sodu

Fig. 5. Effect of *pH* on O_2 uptake by *Str. diacetilactis*. Substrate: 1% glucose + 2% sodium citrate



Rys. 6. Wpływ substratu na przemianę gazową *Str. diacetilactis*

Fig. 6. Effect of substrate on the gaseous exchange of *Str. diacetilactis*



Rys. 7. Wpływ substratu na wydzielanie CO_2 przez *Str. diacetilactis*

1 — 1% glikozy + 2% cytrynianu sodu
2 — 1% laktozy + 2% cytrynianu sodu
3 — przemiana endogenna

Fig. 7. Effect of substrate on CO_2 production by *Str. diacetilactis*

1 — 1% glucose + 2% sodium citrate
2 — 1% lactose + 2% sodium citrate
3 — endogenous metabolism

Najwyższą ilość CO_2 (2218 μl/1 mg P/1 godz) bakterie wytwarzały wobec 1% glikozy + 2% cytrynianu sodu, co potwierdza wyniki uzyskane poprzednio.

W tych samych warunkach maksymalne pobieranie tlenu wynosiło 43,2 μl O_2, przy przemianie endogennej — 23 μl O_2/1 mg P/1 godz.

Wykres 7 ilustruje dynamikę wydzielania CO_2 w czasie 6 okresów półgodzinnych. Maksymalną ilość wydzielanego CO_2 stwierdzono w drugim półgodzinnym okresie przy obecności 1 % glikozy i 2% cytrynianu sodu. W dalszych okresach ilość CO_2 stopniowo spada.

Prawie dziesięciokrotnie niższe ilości CO_2 stwierdzono stosując laktozę i cytrynian sodu (wykres 7).

Wobec tych substratów przemiana zachodziła dość równomiernie, przy nieznacznie zwiększonej intensywności w czwartej półgodzinie.

Brak przemiany gazowej stwierdzono wobec oddzielnych substratów: glikozy w ilości 0,5—2,0%, laktozy 1%, kwasu cytrynowego 0,05% i 1%.

We wszystkich próbach, po ich zakończeniu, przeprowadzono jakościową kontrolę obecności acetoiny i dwuacetylu, a także kontrolowano *pH*.

Obecność acetoiny stwierdzano wyłącznie w próbach, w których przebiegała dekarboksylacja. Poziom *pH* tych prób utrzymywał się na poziomie buforu (*pH* = 6.). Natomiast w próbach, w których nie obserwowano wydzielania CO_2, wartość *pH* ulegała obniżeniu do 5,0 lub do 5,5.

Tabela 1

Wpływ substratów na pobieranie tlenu przez *Str. diacetilactis*
Effect of different substrates on the uptake of oxygen by *Str. diacetilactis*

Substrat	µl O_2/1 mg P bakt.										
	Okres pomiaru co 30' measurement every 30 minutes						po czasie minut after minutes				
	I	II	III	IV	V	VI	60	90	120	150	180
1% glikozy, 2% cytrynianu sodu 1% glucose, 2% sodium citrate	1,40	28,8	14,4	14,4	28,8	14,4	43,2	57,6	72	100,8	115,2
1% laktozy, 2% cytrynianu sodu 1% lactose, 2% sodium citrate	7,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	21	35	49	63	77

Wg danych Maksimowej (1954) optymalne *pH* dla tworzenia acetoiny przez różne szczepy paciorkowców fermentacji mlekowej zawarte jest w granicach 4,6 do 5,5.

WNIOSKI

W przedstawionych doświadczeniach stwierdzono, że zarówno pobieranie tlenu jak i wytwarzanie CO_2 przez *Str. diacetilactis* zachodzi najintensywniej w buforze fosforanowym o *pH* 5,9 do 6,0, wobec substratów: 1% glikozy i 2% cytrynianu sodu (wykresy 3, 4, 5). Proces dekarboksylacji przebiegał liniowo w czasie 3 godzin, ze znacznie większą intensywnością przy użyciu glikozy i cytrynianu sodu niż w obecności laktozy (wykres 6), przy czym maksimum. 1134 µl CO_2/mg P/1 godz., stwierdzono w drugim półgodzinnym okresie doświadczenia (Wykres 7).

Pobieranie tlenu w tych warunkach było prawie równe przemianie endogennej (tabl. 1, wykres 7) i równało się 43,2 μl O_2/1 mg P/godz.

Obecność acetoiny i dwuacetylu stwierdzono wyłącznie w warunkach jednoczesnej intensywnej dekarboksylacji. W próbach, w których nie obserwowano wydzielania CO_2 zmieniała się wartość *pH* z 6,0 na 5,0—5,5.

Przedstawiony charakter przemiany gazowej wykazuje właściwości enzymatyczne *Str. diacetilactis* jako typowego mikroaerofila uzdolnionego do intensywnej dekarboksylacji specyficznych substratów.

LITERATURA

Bennet E. O., Williams R. P., 1957: A comparison of methods of determining bacterial mass with particular emphasis upon the use of total phosphorus. *Appl. Microbiol.*, **5**: 14.

Bång Folke, 1949: Über den Stoffwechsel von *Sc. citrovorus*. *Arkiv Kem.*, **1**: 27.

Christensen D. C., Pederson S., 1958: Factors affecting diacetyl production by lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol.*, **6**: 319.

Green D. E., Westerfeld W. W., Vennesland B., Knox W. E., 1941: Carboxylases of animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **140**: 683.

Gross N. H., Werkman C. H., 1947: Fixation of heavy carbon acetaldehyde by active juices, *Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **12**: 17.

Howells J. D., Lindstrom E. S., 1958: Deoxyribose phosphate and acetoin synthesis by *Bacillus cereus*. *J. Bact.*, **75**: 305.

Juni E., Heym G. A., 1956: Acyloin condensation reactions of pyruvic oxidase. *J. Biol. Chem.*, **218**: 365.

Jakubowska J., Paprocka D., Oberman H., 1959: Kontrola żywotności kilku szczepów bakterii fermentacji mlekowej po reaktywacji ze stanu wysuszenia. *Materiały Zjazdowe XIV Zjazdu Mikrobiolog. Pol.* — Białystok: 57.

Juni E., 1952a: Mechanism of the formation of acetoin by yeast and mammalian tissue. *J. Biol. Chem.*, **195**: 727.

Juni E., 1952b: Mechanism of formation of acetoin by bacteria. *J. Biol. Chem.*, **195**: 715.

Krenn J., Valik D., 1949: Untersuchungen über die Art und Weise der Bildung der Aromastoffe der Butter. *XII Dairy Congress*, Stockholm, **2**: 516.

Maksimowa A., 1954: Obrazowanije aromata w zakwaskach dla masła. *Mołocz. Promyszl.* nr 8: 30.

Matuszewski T., Pijanowski E., Supińska J., 1937: A new lactic *Streptococcus* as a constituent of butter starters. *XI Milchwirt. Welt-Kongress*, Berlin, Section 2: 80.

Matuszewski T., Pijanowski E., Supińska J., 1936: *Streptococcus diacetilactis n. sp.* i jego zastosowanie przy wyrobie masła. *Roczn. Nauk Roln. Leśn.*, **36**: 1.

Mc Bee R. H., Lamanna C., Weeks O. B., 1955: Definitions of bacterial oxygen relationships. *Bact. Rev.*, **19**: 45.

Moat A. G., Lichstein H. C., 1953: Factors affecting the formation of acetylmethylcarbinol by *Lactobacillus arabinosus*. *J. Bact.*, **66**: 324.

Overby A. J., 1946: The formation of flavour in starters and butter determined by the acetoin and diacetyl content. Kopenhaga, Den Kgl. Veterinaerrig Landbohøjskale, Saertryk S.

Oliver W. H., 1952: The stability of some bacterial enzymes toward heat and chemical bactericides. *J. gen. Microbiol.*, **7**: 329.

Oliver W. H., 1953: The effect of carbon dioxide pressure on a bacterial decarboxylase system. *J. gen. Microbiol.*, **8**: 38.

Pette J. W., 1949: Some aspects of the butter aroma problem. *XII Int. Dairy Congress*, Stockholm, **2**: 572.

Singer T. P., Pensky J., 1952: Mechanism of acetoin synthesis by α-carboxylase. *Biochim. Biophys. Acta*, **197**: 163.

Silverman M., Werkman C. H., 1941: The formation of A. M. C. from pyruvic acid by a bacterial enzyme preparation. *J. Biol. Chem.*, **138**: 35.

Supińska-Jakubowska J., 1948: Badania nad *Streptococcus diacetilactis*. *Med. Dośw. Społ.*, **25**: 184.

Supińska-Jakubowska J., 1952: Wytwarzanie acetoiny przez *Str. diacetilactis*. *Acta Microbiol. Polon.*, **1**: 151.

Westerfeld W. W., 1945: A colorimetric determination of blood acetoin *J. Biol. Chem.*, **161**: 495.

Jadwiga Jakubowska and *Helena Oberman*

INFLUENCE OF *pH* AND OF SOME MEDIUM CONSTITUENTS ON THE GASEOUS EXCHANGE AND ACETOIN PRODUCTION BY *STREPTOCOCCUS DIACETILACTIS*

Summary

Oxygen uptake and production of CO_2 were measured in Warburg apparatus. The greatest intensity of both these processes was observed in phosphate buffer (*pH* 5,9—6,0) in the presence of 1 p. c. of glucose and 2 p. c. of sodium citrate as respiration substrates (see Fig. 1—5). The rate of decarboxylation was constant for 3 hours of incubation The rate was much lower in presence of lactose, then when glucose and sodium citrate were used as substrates (see Fig. 6). Maximal CO_2 production (1134 µl CO_2 mg P 1 h) was noted after 30 minutes of observation. The oxygen uptake was on the level of the endogenous metabolism (43.2 µl O_2 1 mg P/1 h) (see Fig. 7 and Table I).

Acetoin and diacetyl were found only simultaneously with strong decarboxylation process. Decrease of CO_2 production was correlated with the change of hydrogen ion concentration (from *pH* 6,0 to *pH* 5,0—5,5).

Presented data show that *Str. diacetilactis* is characterized by the anoxybiontic catabolism of typical microaerofilic microrganisms, capable of intensive decarboxylation of specific substrates.

Adres autorek:
Authors' address:

Prof. Dr Jadwiga Jakubowska,
Katedra Mikrobiologii Technicznej,
Politechnika Łódzka,
Łódź, ul. Wolczańska 171/173.
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 199—204

Helena Karczewska i *Hanna Świeżyńska*

TORULOPSIS PINUS VAR. ALBIDA — NOWA ODMIANA DROŻDŻY, WYIZOLOWANA Z BRUNATNEJ STRUPOWATOŚCI TOPOLI

Z Pracowni Wód Ściekowych Instytutu Badawczego Leśnictwa
Wpłynęło 4 marca 1960 r.

Streszczenie

Niniejsza praca zawiera opis nowej odmiany gatunku drożdży *Torulopsis pinus*, wyizolowanej z brunatnej strupowatości topoli, przekazanej autorom przez Zakład Fitopatologii Leśnej Instytutu Badawczego Leśnictwa.

METODYKA BADAŃ

Odrobinę nalotu występującego w ranie topoli przeniesiono pętlą platynową na brzeczkę piwną o gęstości 8° Ballinga i na drodze wielokrotnych przesiewów na szalki Petriego, zawierające agar brzeczkowy, wyizolowano czystą kulturę drożdży, oznaczonych symbolem *To* (pierwsze litery słów „Topola" i *Torulopsis*).

Charakterystykę drobnoustroju przeprowadzono metodami zalecanymi przez Kudriawcewa (1954) oraz przez Lodder i Kreger (1952).

Wzrost drożdży na pożywce płynnej Readera zawierającej 2% cukrów badano wg Kudriawcewa, wzrost na pożywce płynnej Wickerhama — wg Lodder, asymilację cukrów metodą Beijerincka wykonano według Lodder, fermentację cukrów przeprowadzono wszystkimi metodami zalecanymi przez Lodder i Kudriawcewa, asymilację azotu metodą Beijerincka wykonano według Lodder, asymilację kwasów organicznych — według Kudriawcewa, asymilację alkoholu etylowego — według Lodder, asymilację glicerolu — według Kudriawcewa.

Zarodnikowanie badano wszelkimi metodami, zalecanymi przez Lodder, jak również metodą Fowella (1952), stosowaną w Carlsberg Laboratorium (Kopenhaga), gdzie drożdże *To* zostały przez nas przebadane dodatkowo. Według Lodder oznaczono również: tworzenie grzybni, powstawanie substancji skrobiowych, rozpuszczanie żelatyny, wzrost na agarze ziemniaczanym, próbę z mlekiem lakmusowym, próbę na wytwarzanie kwasów i estrów oraz rozszczepianie arbutyny i tłuszczów.

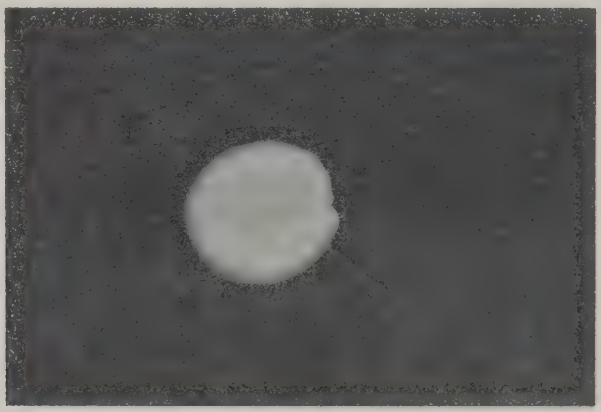
Oznaczanie zawartości substancji redukujących w badanych pożywkach wykonywano metodą opracowaną przez Centralne Laboratorium Celulozowo-Papiernicze (zgłoszone do PKN jako projekt normy drukiem dnia 24. 8. 1950 r. pt. „Oznaczanie substancji redukujących w przeliczeniu na glukozę". Znak projektu VII/$_7$ D.)

WYNIKI BADAŃ

Po dwuletniej obserwacji wyizolowanego szczepu opracowano następującą jego charakterystykę:

Rysa na agarze brzeczkowym — biała, błyszcząca, gładka, mazista o brzegu lekko falistym i środku nieznacznie wklęsłym. Komórki drobne (o średnicy około 3 μ) okrągłe, pączkujące.

Kolonia na agarze brzeczkowym po dwóch tygodniach ma kolor kości słoniowej, jest lekko błyszcząca, gładka, mazista, wypukła, o brzegu gładkim i środku lekko wklęsłym (fot. 1).



Fot. 1. *T. pinus var. albida* — kolonia olbrzymia, 2×.

Kolonia na żelatynie po dwóch tygodniach ma wygląd taki sam, jak kolonia na agarze brzeczkowym.

Po przeszczepieniu na 50 ml brzeczki piwnej o gęstości 8° Ballinga i wstawieniu do termostatu na 48 godzin w 28° brzeczka pozostaje przezroczysta; na dnie skąpy osad. Po 4—5 dniach powstaje pierścień na ściankach kolbki. Wymiary komórek po 72 godz. — średnica od 2.6 do 4.8 μ (komórki okrągłe).

Wzrost na płynnej pożywce zawierającej cukry: po przeszczepieniu drożdży ze skosu agarowego na 50 ml pożywki Readera zawierającej badany cukier — po upływie 48 godzin w 28° pożywka pozostaje przezroczysta, na dnie powstaje skąpy osad, komórki pączkują słabo, *pH* pozostaje bez zmian (około 6,0).

Stopień wykorzystania poszczególnych cukrów ilustruje tabela I.

Badając wzrost drożdży na płynnej pożywce metodą Wickerhama stwierdzono słaby wzrost na glikozie i sacharozie.

Asymilacja cukrów metodą Beijerincka — próby dały wyniki negatywne.

Fermentacja: próby fermentacji cukrów, wykonane wszystkimi metodami zalecanymi przez Kudriawcewa i przez Lodder, wykazały, że badane drożdże fermentowały tylko nieznaczne ilości glikozy.

Tabela I

Stopień wykorzystania cukrów w płynnych pożywkach przez drożdże *To*

Utilization of sugars in liquid medium by the strain *To*

Badany cukier Sugar tested	Stężenie (%) Concentration p. c. początkowe initial	końcowe po 48 godz. final (after 48 hours)	Procent wykorzystania cukru Sugar utilized, p. c. of initial concentration
D-Ksyloza	2.0	1.96	2.0
L-Arabinoza	2.0	1.98	1.0
Maltoza	2.0	1.98	1.0
Sacharoza	2.0	1.84	8.0
Mannoza	2.0	1.92	4.0
Laktoza	1.32	1.32	0.0
Glikoza	2 0	1.94	3.0
Rafinoza	2.0	2.0	0.0
Fruktoza	2.0	2.0	0.0

Asymilacja azotu metodą Beijerincka: drożdże te nie asymilowały azotanu potasowego. Nie stwierdzono u nich również wyraźnych objawów asymilacji siarczanu amonu, asparaginy i mocznika.

Asymilacja kwasów organicznych: wzrost drożdży *To* na pożywkach stałych zawierających badane kwasy przedstawia się następująco: po upływie dwóch tygodni w 28° stwierdzono słaby wzrost na kwasach: octowym, cytrynowym i winowym, wyraźny wzrost na kwasach: jabłkowym i mlekowym, oraz brak wzrostu na kwasie mrówkowym.

Asymilacja alkoholu etylowego i glicerolu: wzrost na pożywce płynnej zawierającej alkohol etylowy jako jedyne źródło węgla następował po 6 dniach w 28°, przy czym na dnie powstawał skąpy osad. Na pożywce stałej zawierającej glicerol wyraźny wzrost następował po upływie tygodnia.

Powstawanie zarodników w worku: szczep drożdży *To* nie tworzy zarodników w worku ani na skosie ziemniaczanym, ani na agarze Gorodkowoj, na pożywce Starkeya i na pożywce Fowella.

Powstawanie *mycelium*: nie stwierdzono zdolności do wytwarzania grzybni. Jednak niektóre komórki tworzą wyrostki, które mogą być uważane za szczątkową grzybnię.

Pączkowanie: komórki szczepu drożdży *To* pączkują multilateralnie.

Zdolności wytwarzania substancji skrobiowych nie stwierdzono.

Rozpuszczanie żelatyny: *To* nie rozpuszcza żelatyny po 6-tygodniowej hodowli.

Wzrost na agarze ziemniaczanym następuje po 3 dniach, a komórki wyrosłe na tej pożywce mają kształt kulisty, lecz o większych wymiarach niż na agarze brzeczkowym.

Mleko lakmusowe zostaje zalkalizowane po 2 tygodniach.

Nie stwierdzono zdolności do wytwarzania kwasów, ani do rozszczepiania arbutyny.

Ponieważ zarówno na pożywkach syntetycznych jak i na brzeczce słodowej stwierdzono bardzo słabe zdolności asymilacji cukru oraz prawie całkowity brak zdolności fermentacyjnych, przeszczepiono drożdże na wodę sokową z ziemniaka, zawierającą po inwersji 0,62% substancji redukujących. Po 24 godzinach stwierdzono zapach miodowy, a po 72 godzinach oznaczono zawartość alkoholu. Obraz mikroskopowy po 72 godzinach — komórki przeważnie kształtu kulistego, układające się w łańcuszki, zawierające od 2 do 5 komórek.

Próby na wytwarzanie estrów i na rozszczepianie tłuszczu dały wynik negatywny.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Na podstawie opisu rodzaju *Torulopsis* Berlese podanego przez Lodder i Kreger (Lodder 1952) szczep *To* powinien być zaliczony do tego rodzaju.

Przy porównywaniu naszego szczepu z opisywanymi przez Lodder gatunkami występują różnice, utrudniające zaliczenie *To* do któregokolwiek z gatunków.

Od *T. colliculosa* *To* różni się istnieniem wyrostków, wyglądem rysy na agarze brzeczkowym, wzrostem na etanolu, brakiem fermentacji cukrów;

od *T. molischiana* — kształtem komórek, kolorem rysy, wyrostkami oraz brakiem zdolności do rozszczepiania arbutyny;

od *T. famata* — kształtem komórek na agarze brzeczkowym wyrostkami;

od *T. stellata* — kształtem komórek na agarze brzeczkowym i wyrostkami;

od *T. bacillaris* — kształtem komórek, wyglądem rysy na agarze oraz wyrostkami;

od *T. ernobii* — wyrostkami;

od *T. pinus* — wyrostkami i wzrostem na etanolu oraz wyglądem rysy po upływie miesiąca;

od *T. inconspicua* — kształtem komórek, wyrostkami.

Poza tym występują różnice w asymilacji i fermentacji cukrów (tak np. *T. ernobii* asymiluje maltozę, a *T. famata* — galaktozę), które ewentualnie można by pominąć w tym wypadku, kiedy Lodder tworzy gatunek na podstawie przebadania tylko jednego szczepu — jak to ma miejsce właśnie w przypadku *T. ernobii*, *T. pinus* oraz *T. magnoliae*.

Wobec powyższego wydaje się słuszne uznać drożdże *To* za odmianę gatunku, do którego wykazują one największe podobieństwo. Odchylenia bowiem w cechach badanych drożdży występują bardzo często przy ich porównywaniu z cechami gatunków, przyjętymi w klasyfikacji Lodder (Kudriawcew, 1958).

Wyglądem komórek *To* jest zbliżony najwięcej do *T. pinus* i to zarówno pod względem kształtu, jak i posiadania pewnego zgrubienia błonki, które może być uznane za otoczkę.

Ze względu na istniejące wymienione różnice autorzy proponują potraktować szczep *To* jako odmianę *T. pinus*.

Dla podkreślenia białego koloru rysy na agarze skośnym autorzy proponują następującą nazwę szczepu:

Torulopsis pinus var. albida.

LITERATURA

Centralne Laboratorium Celulozowo-Papiernicze — Projekt normy pt. „Oznaczanie substancji redukujących w przeliczeniu na glikozę" 24. 8. 1950. Znak projektu VII/7 D.

Fowell R. R., 1952: Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast. *Nature*, 170: 578.

Kudriawcew W., 1954: Sistiematika drożżej. Moskwa, A. N. SSSR.

Kudriawcew W., 1958: Problemy sistiematiki i ewolucyi mikroorganizmow. Trudy Instituta Mikrobiołogii, V, Moskwa, A. N. SSSR.

Lodder J., Kreger van-Rij N. J., 1952: The Yeast. A Taxonomic Study. Amsterdam, North-Holland Publ. Co.

Helena Karczewska and *Hanna Świeżyńska*

TORULOPSIS PINUS VAR. ALBIDA — A NEW YEAST VARIETY ISOLATED FROM THE POPLAR BROWN CRUST

Summary

The authors isolated the new yeast variety from the poplar brown crust.

The variety is similar with the species *Torulopsis pinus*, but due to some differences it should be, according to the authors, classified as a new variety *Torulopsis pinus var. albida.*

The characteristics, in the respect of which the new variety differs from *T. pinus*, as described by Lodder, are: white pigmentation of the colonies on agar slants, cells with short protuberances, the type of growth on media containing ethanol.

Adres autorek:
Authors' address:

Instytut Badawczy Leśnictwa
Pracownia Wód Ściekowych
Warszawa 22,
ul. Wery Kostrzewy 3.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 205—209

Maria Brzozowska

FIZYKO-CHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI DEKSTRANU SYNTETYZOWANEGO PRZEZ SZCZEPY *LEUCONOSTOC* RÓŻNEGO POCHODZENIA

Z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie
Wpłynęło dnia 10 października 1960 r.

Streszczenie

Szczepy *Leuconostoc*, pochodzące z cukrowni, produkują przeważnie dekstran trudno rozpuszczalny, o niskiej skręcalności właściwej. Szczepy izolowane z lemoniad, owoców i soku drzew tworzą dekstran łatwo rozpuszczalny.

WSTĘP

Istotnym zagadnieniem dla przemysłu jest otrzymywanie dekstranu o jednorodnych cechach fizyko-chemicznych. Z tego względu podjęto prace nad zbadaniem czy pochodzenie szczepów dekstranotwórczych ma wpływ na cechy fizyko-chemiczne wytwarzanego przez nie dekstranu. Bakterie dekstranotwórcze wyosobniono z kilku środowisk naturalnych i przemysłowych: z soku dyfuzyjnego i tzw. „żabiego skrzeku" z cukrowni, z gałązek drzew na wiosnę, z lemoniad oraz z owoców.

METODYKA BADAŃ

Czyste kultury wyodrębniano metodą płytkową na podłożu wg Januszewicz i Wojcieszaka (1954).

Szczepy bakterii charakteryzowano wg Bergeya (Bred, Murray, Hitchens 1948), a następnie prowadzono biosyntezę dekstranu na podłożu płynnym wg Januszewicz, z dodatkiem 0,3% objętości autolizatu drożdżowego.

W tym celu pożywkę rozlewano do półlitrowych kolb Erlenmayera po 200 ml i wyjaławiano w 112° w ciągu 20 minut. Do sterylnego podłoża dodawano autolizat drożdżowy wg Omeliańskiego (1940), jałowiony uprzednio sączeniem przez filtr Seitza. Podłoże szczepiono 22-godzinną hodowlą płynną w ilości równej 5% objętości podłoża. Fermentację prowadzono 3 doby w 20 do 25°. Po zakończonej fer-

Tabela I

Właściwości wyosobnionych szczepów *Leuconostoc* — Characteristics of isolated *Leuconostoc* strains

Symbol szczepu Strain	Pochodzenie szczepów Source of strains: miejscowość locality	materiał badawczy material	Mleko lakmus Litmusmilk	Fermentacja (6 dni, 22°) Fermentation (6 days): arabinoza	ksyloza	ramnoza	glukoza	fruktoza	galaktoza	mannoza	laktoza	sacharoza	maltoza	rafinoza	skrobia	gliceryl	mannitol	sorbitol	Zaliczono do gatunku Species
L_2	Warszawska sklep	lemoniada	z	++	++	—	++	++	++	++	++	+++	x	++	x	x	+	+	*L. mesenteroides*
+++	rozlewnia lemoniady	lemoniada	z	++	++	++	++	+	—	++	—	+++	—	++	—	—	—	++	*L. mesenteroides*
L_2	„ „	„	z	++	++	—	++	++	++	—	+	+++	++	++	—	—	—	—	*L. mesenteroides*
L_3	„ „	„	z	++	++	—	++	++	++	—	+	+++	++	++	—	—	—	—	*L. mesenteroides*
L_4	„ „	„	zr	++	++	++	++	++	+	+	+	+++	++	++	—	—	+	+	*L. mesenteroides*
C_1	Michałów, cukrownia	sok dyfuzyjny	z	++	++	++	+	++	++	++	—	+++	++	++	++	—	—	—	*L. mesenteroides*
C_3	Kętrzyn, cukrownia	„ „	z	++	++	—	++	++	++	++	+	+++	++	++	—	—	—	+	*L. mesenteroides*
C_4	Chybie, cukrownia	żabi skrzek	z	++	+	++	++	++	++	++	++	+++	++	+	—	—	+	—	*L. mesenteroides*
C_5	Wieluń, cukrownia	sok dyfuzyjny	p	—	—	+	++	++	++	++	+	+++	++	++	—	—	—	—	*L. dextranicum*
C_6	Kętrzyn, cukrownia	„ „	z	++	++	+	++	++	++	++	++	+++	++	++	—	—	—	—	*L. mesenteroides*
C_7	Kościan, cukrownia	„ „	z	—	—	—	++	++	+	+	++	+++	++	++	—	—	—	—	*L. dextranicum*
C_8	Gryfice, cukrownia	żabi skrzek	z	++	++	+	++	++	+	+	++	+++	++	++	—	—	+	+	*L. mesenteroides*
C_9	„ „	sok dyfuzyjny	z	+	++	+	++	++	++	++	+	+++	++	+	—	—	+	—	*L. mesenteroides*
C_{11}	Wieluń, cukrownia	żabi skrzek	z	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	—	—	+	—	—	*L. mesenteroides*
P	Międzygórze	owoc poziomki	z	++	++	—	++	++	+	—	+	+++	++	++	—	—	—	—	*L. mesenteroides*
S	Sieczków	owoc śliwki	z	++	++	+	++	++	+	++	++	+++	++	++	+	—	+	+	*L. mesenteroides*
S_1	Wólka Wysoka	„ „	zr	++	++	—	++	++	++	++	++	+++	++	—	—	+	—	—	*L. mesenteroides*
G	Sieczków	owoc gruszki	zr	++	++	—	++	++	++	—	—	+++	++	+	—	—	—	—	*L. mesenteroides*
J	Sieczków	owoc jabłka	zr	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++	++		—	—	—	*L. mesenteroides*
W_1	okolica Warszawy	gałązka wiśni	z	++	++	—	++	++	++	+	+	+++	++	—	—	—	—	—	*L. mesenteroides*
P_m	Grójec	„ „	z	++	++	+	++	++	++	—	++	+++	++	++	+	+	++	+	*L. mesenteroides*

Objaśnienia: Explanations:

— brak rozwoju, no growth *pH* 7,1 — 6,8; + słaby rozwój, slight growth *pH* 7,0 — 6,5; ++ dobry rozwój, good growth *pH* 6,6 — 4,5; +++ bardzo bujny rozwój, very good growth *pH* 4,5 — 3,9; x nie badano, not examined; z zakwaszenie, acidity; r redukcja, reduction; p peptonizacja, peptonisation.

mentacji oznaczono wydajność dekstranu metodą wagową lub metodą pośrednią, opierającą się o oznaczanie w brzeczce zawartości fruktozy (Kaniuga 1957). Fruktozę oznaczano metodą Luffa-Schoorla (Struszyński 1950). Wyniki obu metod były bardzo zbliżone. Podano je jako wartości średnie z kilku doświadczeń w tabeli II.

Tabela II

Właściwości dekstranu i jego wydajność
Characterisation and yield of dextrans

Szczep, symbol Strain	Wydajność dekstranu w stosunku do wprowadzonej sacharozy % Yield, p. c. of initial saccharose	Własności fizyko-chemiczne dekstranu Physico-chemical properties of dextran		
		Rozpuszczalność w wodzie Solubility in water	Skręcalność właściwa $[\alpha]_D$	% wiązań 1,6 p. c. of 1,6 links
L. mesenteroides (C_1)	5	+	190	88,6
L. mesenteroides (C_4)	3	+	160	79,5
L. dextranicum (C_5)	5	+	180	81,8
L. mesenteroides (C_8)	10	+	180	75,0
L. mesenteroides (C_8)	20	+	160	70,0
L. mesenteroides (C_9)	12	+	160	79,5
L. mesenteroides (C_{11})	15	+	184	69,7
L. mesenteroides (S_1)	11	+	180	88,4
L. mesenteroides (C_3)	5	++	170	75,0
L. dextranicum (C_7)	10	++	160	85,5
L. mesenteroides (P_m)	47	++	196	88,9
L. mesenteroides (W_1)	25	++	178	83,3
L. mesenteroides (*L*)	47	++	198	90,0
L. mesenteroides (L_1)	36	++	184	80,0
L. mesenteroides (L_2)	35	++	196	73,0
L. mesenteroides L_3	38	++	198	83,0
L. mesenteroides L_4	37	++	198	80,0
L. mesenteroides *G*	31	++	190	87,5
L. mesenteroides *I*	36	++	182	87,5
L. mesenteroides *P*	36	++	184	83,3
L. mesenteroides *S*	37	++	182	80,0

Objaśnienia:
Remarks: ++ — duża, great, + — mała, small

Przydatność przemysłowego dekstranu badano na podstawie jego zdolności rozpuszczania się w wodzie (Jeanes i współpracownicy 1954).

Wykonano następujące oznaczenia dla scharakteryzowania otrzymanych próbek dekstranu: a) rozpuszczalność w wodzie, b) skręcalność właściwa, c) procent wiązań 1.6. Rozpuszczalność badano w różnych temperaturach: dekstran bardzo dobrze rozpuszczalny rozpuszczał się w temperaturze pokojowej przy energicznym wstrząsaniu w ciągu kilku minut, dekstran dobrze rozpuszczalny rozpuszczał się po podgrzaniu

do 70° w ciągu 3 godzin, wreszcie dekstran trudno rozpuszczalny to taki, który w 120° rozpuszczał się w ciągu 3 godzin.

Próby dekstranu przeznaczone do oznaczania skręcalności właściwej i ilości wiązań 1,6 oczyszczano uprzednio od cukrów oraz soli mineralnych pochodzących z pożywki (Kaniuga 1957). Właściwą skręcalność oczyszczonego dekstranu (0,5-procentowy roztwór w 1 N ługu sodowym) oznaczano w polarymetrze kołowym przy użyciu lampy sodowej, w rurce o długości 1 dcm.

Ilość wiązań 1,6 oczyszczonego dekstranu oznaczano przez utlenianie nadjodanem wg techniki Jeanesa i Wilhama (1950), uzupełnionej przez Rankina i Jeanesa (1954) i przystosowanej do oznaczeń dekstranu produkowanego przez szczep *L. mesenteroides „L"* (Kaniuga 1957).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Wyodrębniono 21 szczepów z 567 pobranych prób. Z pięciu prób lemoniady, wykazującej zmętnienie względnie zgęstnienie, wyosobniono 5 szczepów; z 29 prób soku dyfuzyjnego lub „żabiego skrzeku" z cukrowni wyosobniono 9 szczepów. Z 205 prób owoców wyosobniono 5 szczepów, a z 141 prób gałązek drzew owocowych pobranych na wiosnę wyosobniono 2 szczepy. Z 187 prób gałązek drzew leśnych z okolic Warszawy nie otrzymano ani jednego szczepu.

Na podstawie danych diagnostycznych zestawionych w tabeli I, z 21 wyizolowanych szczepów 2 zaliczono do gatunku *L. dextranicum*, pozostałe zaś do gatunku *L. mesenteroides*.

Wyniki przeprowadzonych badań fizyko-chemicznych syntetyzowanego przez te szczepy dekstranu ujęte zostały w tabeli II. Dane te wydają się wskazywać, że istnieje pewna zależność między środowiskiem występowania szczepu dekstranotwórczego a cechami produkowanego przez niego dekstranu (rozpuszczalnością w wodzie i skręcalnością właściwą). Szczepy pochodzące z cukrowni tworzyły dekstran przeważnie trudno rozpuszczalny w wodzie, charakteryzujący się niższą skręcalnością właściwą (160—180°), natomiast szczepy pochodzące ze wszystkich innych środowisk wytwarzały dekstran łatwo rozpuszczalny, o wyższej skręcalności właściwej (w granicach od 182 do 198°). Nie stwierdzono natomiast różnic w ilości wiązań 1,6 w próbach dekstranu syntetyzowanego przez szczepy różnego pochodzenia. Ilość wiązań 1,6, wyrażona w procentach, wahała się, dla dekstranu trudno rozpuszczalnego od 69,7 do 88,6%, dla łatwo rozpuszczalnego od 73 do 90%. Najwyższy procent wiązań 1,6 (około 90%) stwierdzono w dekstranie syntetyzowanym przez szczep wyodrębniony z lemoniady, oznaczony symbolem „L", stosowany do produkcji dekstranu od 1952 r. (Januszewicz i Wojcieszak 1954).

Za udzieloną mi bezpośrednią pomoc i wskazówki składam podziękowanie Pani mgr Irenie Januszewicz, kierownikowi Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego.

LITERATURA

Breed R. S., Murray E. G. D., Hitchens F., 1948: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore.

Januszewicz I., Wojcieszak P., 1954: Biosynteza dekstranu przy pomocy szczepu *Leuconostoc mesenteroides „L"*. *Prace Gł. Inst. Przem. Roln. Spoż.*, t. 4, z. 3.

Jeanes A., Haynes W. C., Wilham C. A., Rankin J. C., Malvin E. H., Austin M., Cluskey I. E., Tischer B. S., Tsuchys H., Rist C., 1954: Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. *J. Am. Chem. Soc.*, 76: 5041.

Jeanes A., Wilham C. A., 1950: Periodate oxidation of dextran. *J. Am. Chem Soc.*, 72: 2655.

Kaniuga B., 1957: Opracowanie metod mikrobiologicznej i chemicznej kontroli przebiegu fermentacji dekstranowej oraz produktu końcowego. Dokumentacja Inst. Przem. Ferment. Praca nie publikowana.

Omeliański W. Ł., 1940. Prakticzeskoje rukowodstwo po mikrobiołogii. Akad. Nauk SSSR Moskwa—Leningrad.

Rankin I. C., Jeanes A., 1954, *J. Am. Chem. Soc.*, 76: 4435.

Struszyński M., 1950: Analiza ilościowa i techniczna. Warszawa, t. 3.

Maria Brzozowska

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF DEXTRAN PRODUCED BY *LEUCONOSTOC* STRAINS OF DIFFERENT ORIGIN

Summary

Two strains of *L. dextranicum* and nineteen strains of *L. mesenteroides* were isolated, chiefly from samples of nonalcoholic beverage, from fruits and tree branches. Some strains were found in sugar-factories.

It was shown that the strains isolated in sugar-factories produced dextran of low solubility and lower $[\alpha]_D$ then the strains of other origin. The number of 1.6 links was similar in all samples of dextran.

Adres autorki:
Author's address:

Mgr Maria Brzozowska,
Zakład Mikrobiologii Przemysłowej,
Instytut Przemysłu Fermentacyjnego,
Warszawa, Rakowiecka 8.
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 211—219

Lidia Kosewska

MIKROFLORA NIEKTÓRYCH PRZECIERÓW I KONCENTRATÓW POMIDOROWYCH PRODUKOWANYCH W POLSCE. I

Z Zakładu Technologii Przetwórctwa Owocowo-Warzywnego
Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie

Wpłynęło dnia 28 maja 1960 r.

Streszczenie

Przebadano kilkadziesiąt próbek przecierów i koncentratów pomidorowych. Produkty pasteryzowane pozostawały jałowe. Koncentraty utrwalone środkami chemicznymi, w przypadku zepsucia, zawierały duże ilości drobnoustrojów. Ustalono maksymalne, dopuszczalne zakażenie dla produktów różnego przeznaczenia.

Przeciery i koncentraty pomidorowe, dzięki niskiemu *pH* uniemożliwiają rozwój większości drobnoustrojów i skutkiem tego tylko nieliczne grupy mogą powodować zepsucie produktów tego rodzaju.

Rozróżnia się zepsucie dwojakiego rodzaju: 1. z wytwarzaniem gazu, 2. bez wytwarzania gazu.

Zepsucia połączone z wytwarzaniem gazu spowodowane są rozwojem bakterii oraz drożdży.

Pederson (1929) z zepsutych konserw pomidorowych wyizolował następujące gatunki bakterii mlekowych: *Leuconostoc pleofructi*, *Latobacillus lycopersici*, *L. gayoni*, *L. pentoaceticus*, *L. plantarum* i *L. mannitopoeum*. Supińska-Jakubowska (1951) wyizolowała ze świeżego przecieru pomidorowego, utrwalonego przepisową dawką 1‰ benzoesanu sodowego *L. brevis*. Rozwój tych bakterii był powodem masowej fermentacji tak utrwalonego przecieru pomidorowego. Autorka stwierdziła, że benzoesan sodu dopiero w stężeniu 3‰ hamował rozwój tych bakterii. Camargo i Phaff (1957) podają, że drożdże *Hanseniaspora uvarum*, *Klockera apiculata*, *Pichia kluyveri* i *Candida catenulata* powodują fermentację nieutrwalonych przecierów pomidorowych, rozkładając cukry na etanol i duże ilości dwutlenku węgla.

Zepsucia bez wytwarzania gazu, czyli tzw. płasko-kwaśne (flat-sour) wywołuje głównie *Bacillus thermoacidurans*, opisany szczegółowo przez Sterna, Hegarty i Williamsa (1942), Beckera i Pedersona (1950). Wpływ liczby komórek *B. thermoacidurans* w 1 ml soku pomidorowego na jego *pH* przebadał White (1951) i wykazał, że soki o *pH* 4,18 nieraz mogą już wykazywać zepsucie płasko-kwaśne. Csiba (1954) wyizolował z niezbombażowanych konserw pomidorowych, zawierających cebulę i paprykę, *Bacillus subtilis*. Rogaczewa i Kostrowa (1956) z około 1000 różnych próbek produktów pomidorowych wyizolowały następujące gatunki: *Bacillus cereus, B. mesentericus fuscus, B. alvo-lactis, B. thermoacidurans*, oraz bakterie kwasu masłowego. Autorki jednak nie podały jakie zmiany wywołują te bakterie w przebadanych produktach. Ragneb i Fabian (1955) podały, że różne gatunki pleśni z rodzajów *Penicillium, Alternaria, Coletotrichum, Fusarium. Mucor, Rhizopus, Aspergillus, Oospora* i *Botrytis* atakowały pomidory i produkty pomidorowe, powodując ich zepsucie połączone z hydrolizą pektyn.

Niniejsza praca miała na celu poznanie mikroflory produktów pomidorowych produkowanych w Polsce, opracowanie właściwej metodyki badań mikrobiologicznych oraz ustalenie granic zakażenia dopuszczalnego dla tego rodzaju produktów.

METODYKA BADAŃ

Przeciery i koncentraty pomidorowe badano pod względem mikrobiologicznym, chemicznym i organoleptycznym.

Badania mikrobiologiczne przeprowadzono wg metodyki opracowanej przez Kosewską (1959, 1960), obejmującej następujące punkty:

1. próba termostatowa w 30° w ciągu 7 dni (badanie to przeprowadzano tylko z produktami w małych opakowaniach),
2. oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów obecnych w 1 g produktu, metodą bezpośredniego liczenia pod mikroskopem,
3. oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów, obecnych w 1 g produktu, metodą płytkową,
4. określenie grup wykrytych drobnoustrojów.

Badanie mikrobiologiczne przeprowadzano na próbkach nie wykazujących żadnych uszkodzeń, ani nieszczelności opakowania, badając równolegle próbki poddane i nie poddane próbie termostatowej.

Oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów metodą bezpośredniego liczenia pod mikroskopem: 0,05 ml nierozcieńczonego przecieru, lub koncentratu pomidorowego z rozcieńczenia 1 : 10, rozprowadzano na powierzchni 4 cm^2 szkiełka przedmiotowego, utrwalano, barwiono fioletem goryczkowym i oglądano pod mikroskopem. Strzępki grzybni obliczano pod najmniejszym powiększeniem, przeliczając całą powierzchnię preparatu, a drożdże i bakterie przy użyciu obiektywu imersyjnego, przeliczając 25—30 pól widzenia.

Oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów metodą płytkową: a) po 1 ml i 0,1 ml przecierów pomidorowych, b) po 1 ml z rozcieńczeń 1 : 5; 1 : 10, 1 : 100 koncentratów nie wykazujących zepsuć, c) po 1 ml z rozcieńczeń 1 : 1000; 1 : 10.000; 1 : 100.000 zepsutych koncentratów posiewano na następujące pożywki:

a) „kompleksową z agarem" * o składzie: brzeczka, woda drożdżowa, sok pomidorowy, zmieszane w równych ilościach, 1% glikozy, 1% $CaCO_3$, 1.5% agaru, *pH* 5,2—5,4.

b) agar odżywczy z 1% glikozy,

c) Camerona.

Oznaczenie grup drobnoustrojów: po 1 ml badanego materiału w rozcieńczeniu 1 : 10 posiewano do następujących pożywek: Wrzoska — ogrzanej lub nie po posiewie, Mc Clunga i Coya — ogrzanej po posiewie (Burbianka i Pliszka 1957) oraz do soku pomidorowego o *pH* 4,2.

Hodowle na pożywce „kompleksowej z agarem", Mc Clunga i Coya i na soku pomidorowym inkubowano w 30° w ciągu 72—96 godzin, na agarze odżywczym i na pożywce Wrzoska — w 37° w ciągu 48 godzin, a na pożywce Camerona w 55° w ciągu 48 godzin.

Z kolonii wyrosłych na płytkach i z dodatnich posiewów na pożywkach namnażających (po uprzednim przeszczepieniu na podłoża agarowe) wyodrębniano czyste kultury, które przeszczepiano na sok pomidorowy. Te z nich, które rosły na soku pomidorowym, uznano za zdolne do wywoływania zepsuć produktów pomidorowych i pozostawiono je do dalszej identyfikacji.

Badanie chemiczne obejmowało oznaczenia: *pH* — za pomocą pehametru „Radiometer" przy użyciu elektrody szklanej i kalomelowej; zawartość ekstraktu — refraktometrem wg skali cukrowej; kwasowość ogólną — metodą miareczkową 0,1 N NaOH; zawartość cukrów ogółem — metodą Lane-Eynona.

Badanie organoleptyczne przeprowadzano wg instrukcji opracowanej przez Sewer-Lewandowską i Borlicką (1958) oznaczając: barwę, zapach, konsystencję i smakowitość.

WYNIKI BADAŃ

W 6 zakładach produkcyjnych przebadano:

7 próbek przecierów pomidorowych, z tego 6 pasteryzowanych 1 utrwalany chemicznie,

116 próbek koncentratów pomidorowych o zawartości 20% ekstraktu, z tego 25 próbek pasteryzowanych, a 87 utrwalanych benzoesanem sodowym w ilości 1‰.

Przeciery pomidorowe, pasteryzowane wykazywały niewielkie zakażenia; na pożywkach namnażających nie zaobserwowano wzrostu.

Przecier utrwalony chemicznie był silnie zakażony pałeczkami zakwaszającymi, które spowodowały obniżenie *pH* produktu, oraz zmianę cech organoleptycznych, dyskwalifikując go zupełnie jako artykuł spożywczy (Tabela I).

* pożywka ta została wprowadzona przez Jakubowską w Katedrze Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej do hodowli bakterii z grupy fermentacji mlekowej.

Tabela I

Wyniki badań mikrobiologicznych przecierów pomidorowych
Microbiological examination of tomato pulp

Nr	Próba przecieru Pulp sample		pH przecieru pH of pulp	Liczba drobnoustrojów w 1 g przecieru Number of microorganisms in 1 g of tomato pulp					Drobnoustroje wyodrębnione Microorganisms isolated
				mikroskopowo direct microscopic count		metoda płytkowa viable count			
	Sposób utrwalania Means of preservation	Wynik próby termostatowanej Result of incubator test		drożdże yeasts x 10^6	bakterie bacteria x 10^6	kompleksowa z agarem complex agar medium	agar odżywczy nutrient agar	Camerona Camerone's medium	
						30°	37°	55°	
1	Pasteryzowany	—	4,15	1,35	1,00	0	2	0	L
2	Pasteryzowany	brak bombażu	4,15	1,10	1.50	0	0	0	—
3	Pasteryzowany	—	4,25	1,10	1,20	1	3	0	L, P, D,
4	Pasteryzowany	brak bombażu	4,3	0,42	1,50	4	15	1	Lm, Lt,
5	Pasteryzowany	—	4,1	0	4,50	0	0	0	—
6	Pasteryzowany	—	4,32	1,00	13,00	0	7	0	L
7	Utrwalany chemicznie	—	3,8	0,60	22,00	70,000	70,000	0	Pz

— nie badano
— not examined

Objaśnienia:
Explanations.

L — laseczki — bacilli
P — pałeczki — rods
D — drożdże — yeasts
Lm — laseczki mezofilne — mesophilic bacilli
Lt — laseczki termofilne — thermophilic bacilli
Pz — pałeczki zakwaszające — acidifying bacteria

Uwaga: żadna próbka nie zawierała grzybów. Przy wysiewie na płynne podłoża otrzymano wzrost pałeczek na soku pomidorowym i podłożu Wrzoska tylko z próbki Nr 7.

Note: No fungal hyphae were found. On liquid media no growth was observed, except sample No 7 — from which rods were grown on Tarrozi-Wrzosek medium (unheated) and on tomato juice.

Tabela II

Mikrobiologiczna i chemiczna charakterystyka koncentratów pomidorowych, pasteryzowanych
Microbiological and chemical examination of pasteurised tomato paste

Koncentraty Tomato paste	Ilość prób Number of samples	Ogólna liczba drobnoustrojów w 1 g koncentratu Number of microorganisms in 1 g of tomato paste: bezpośrednie liczenie pod mikroskopem direct microscopic count — strzępki grzybni mould filaments x 10^5	bezpośrednie liczenie pod mikroskopem direct microscopic count — drożdże yeasts x 10^6	bezpośrednie liczenie pod mikroskopem direct microscopic count — bakterie bacteria x 10^6	metoda płytkowa viable count — kompleksowa z agarem complex agar medium	metoda płytkowa viable count — agar odżywczy nutrient agar	Drobnoustroje wyodrębnione Microorganisms isolated	pH	Zawartość ekstraktu Contents of extract %	Kwasowość ogólna Total acidity %	Cukry ogółem Sugars — total %	Ocena organoleptyczna Organoleptic assessment
Badane bez termostatowania (before incubation)	1	0,26	0	3,4	10	10		4,45	19,6	7,15	9,60	dobry
	1	0,43	0	6,0	C	0	laseczki	4,40	20,0	8,35	9,99	dobry
	2	0.07,—0,28	0—1,5	10,0—18,0	0—10	0—10	laseczki	4,21	19,5	7,50	9,94	dobry
	1	0	0,5	2,5	5	0	laseczki	4,20	21,0	6,40	—	dobry
	2	0	0—0,7	3,0—32,0	0—20	0	laseczki	4,10	20,3	8,00	—	dobry
	1	0	0,14	3,0	4	0	laseczki	4,10	31,0	6,68	16,50	b. dobry
	6	0	0,6—0,8	2,4 –3,0	0—5	0—10	laseczki	4,02	21,6	7,50	11,60	dobry
	2	0	0,5	2,0—2,2	0	0—10	laseczki	3,95	21,7	7,32	11,65	dobry
	1	0	0	100,0	0	0		3,95	20,0	10,70	—	dobry
Badane po próbie termostatowej (after incubation)	2	0,10—0,80	0—1,5	9,0—17,0	0—10	0—10	laseczki	4,21	19,80	7,60	9,98	dobry
	2	0	0	32,0—68,0	0—10	0—10	laseczki	4,05	20,2	10,80	—	dobry
	3	0	0,6—0,7	2,0— 3,5	0	0		4,00	22,0	7,80	11,40	dobry
	2	0	0,4—0,65	2,0— 3,0	0—10	0—01	laseczki	3,97	31,0	6,80	11,26	dobry
	3	0	0,70—0,75	2,5— 4,0	0	0		3,95	21,0	6,80	11,48	dobry
	2	0	0,60—0,80	2,4— 2,85	0	0		3,93	21,1	7,4	11,6	dobry

— nie badano
— not examined

Uwaga: laseczki — bacilli
Note: dobry — good
b. dobry — very good

W tabeli II przedstawione są wyniki badań koncentratów pasteryzowanych. Koncentraty zostały uporządkowane wg wartości *pH*.

Koncentraty pomidorowe, pasteryzowane, były w większości przypadków jałowe. Próbki poddane próbie termostatowej nie wykazały bombażu, ani większego zakażenia od próbek badanych bez uprzedniego termostatowania. Koncentraty niejałowe wykazywały na pożywce kompleksowej z agarem i na agarze odżywczym obecność laseczek mezofilnych, typu *B. subtilis-mesentericus*. Żaden ze szczepów nie rósł na soku pomidorowym o *pH* 4,2, a tylko 5 szczepów rosło na soku o *pH* 4,8. Na pożywce Camerona i na pożywkach płynnych nie otrzymano wzrostu.

W tych koncentratach zawartość ekstraktu i kwasowość ogólna na ogół były zgodne z wymaganiami normy, *pH* wahało się od 4,45—3,93, zawartość cukrów ogółem wynosiła od 9,60—11,65%, tzn. około 50% zawartości ekstraktu. Pod względem organoleptycznym wszystkie koncentraty na ogół były dobre, a jeden, o zawartości 31% ekstraktu, był bardzo dobry.

Wyniki badań wybranych koncentratów utrwalonych chemicznie zebrano w tabeli III. Koncentraty te podzielono pod względem organoleptycznym na 3 grupy.

W koncentratach uznanych za dobre ilości drobnoustrojów wykrywane mikroskopowo były nie większe niż w koncentratach pasteryzowanych. W większości przypadków nie stwierdzono wzrostu drobnoustrojów na płytkach. Nieliczne, niejałowe koncentraty wykazały wzrost do 240 drobnoustrojów w 1 g produktu i to głównie laseczek typu *B. subtilis-mesentericus*, rzadziej pałeczek zakwaszających.

Żaden z koncentratów umieszczonych w drugiej grupie nie był jałowy. Wysokie zakażenie pierwotne wpłynęło na cechy chemiczne wyprodukowanych koncentratów. Stwierdzono obniżenie zawartości cukrów ogółem (poniżej 45% w stosunku do ekstraktu) oraz w niektórych przypadkach obniżenie zawartości ekstraktu.

Koncentraty, zaliczone do zepsutych, badane metodą bezpośredniego liczenia pod mikroskopem wykazały obecność od 150 milionów do 575 milionów bakterii. Metodą płytkową stwierdzono obecność głównie pałeczek zakwaszających i drożdży, a rzadziej pleśni i laseczek. Wszystkie te koncentraty wykazały obniżenie zawartości ekstraktu, niską zawartość lub też zupełny brak cukrów ogółem, podwyższenie lub też nadmierne obniżenie *pH*.

Pałeczki zakwaszające, drożdże i pleśnie wyizolowane z koncentratów utrwalanych środkami chemicznymi rosły dobrze na soku pomidorowym o *pH* 4,2 i 4,8. Uznano przeto, że psucie się produktów pomidorowych może być przez nie wywoływane. Natomiast spośród 20 wyizolowanych szczepów laseczek tylko 4 rosły na soku o *pH* 4,8.

Tabela III

Właściwości mikrobiologiczne i chemiczne koncentratów pomidorowych utrwalonych środkami chemicznymi
Microbiological and chemical examination of tomato paste chemically preserved

Koncentraty Tomato paste	Ilość prób Number of samples	Liczba drobnoustrojów w 1 g koncentratu Number of microorganisms in 1 g of tomato paste: bezpośrednie liczenie pod mikroskopem direct microscopic count: strzępki grzybni mould filaments x 10^5	drożdże yeasts x 10^6	bakterie bacteria x 10^6	metoda płytkowa viable count: kompleksowa z agarem complex agar medium	agar odżywczy nutrient agar	Camerona Camerone's medium	Drobnoustroje wyodrębnione Microorganisms isolated	Wzrost na pożywkach płynnych Growth on liquid media: Sok pomidorowy Tomato juice	Mc Clunga i Coya Mc Clung's and Coy's medium	Wrzoska Wrzosek's medium: nieogrzewana unheated	Wrzoska Wrzosek's medium: ogrzewana heated	pH	Zawartość ekstraktu Contents of extract %	Kwasowość ogólna Total acidity %	Zawartość cukrów ogółem Contents of sugars %
	5	0,03—0.20	0,3—6,3	8,4—100,0	0—20	0—240	0—20	laseczki mezo- i termofilne	brak wzrostu	brak wzrostu	brak* wzrostu	brak* wzrostu	4,60—4,35	18.5—20.5	2,30—7,34	8,70—10,65
Dobrej jakości	6	0	0,4—0,9	4,0—10,0	0—10	0—10	0	laseczki mezofilne	,,	,,	,,	,,	4.25—4.20	20.5—21.5	6,00—13,80	9,20—10,60
Good	10	0	0,3—0,9	3,0—7,6	0—20	0	0	laseczki mezofilne	,,	,,	,,	,,	4,15—4.11	19.6—20.5	3,80—12,00	8,97—10,38
	16	0	0,4—17,0	3,5—22,0	0—40	0	0	laseczki i pałeczki zakwaszające	,,	,,	,,	,,	4,10—4,00	20,5—20,8	10,30—11,90	9,30—10,64
	1	0	0	630,0	20	przerośnięta	0	laseczki	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu	brak wzrostu	4,15	20,5	3,8	9,44
Złe w smaku choć nie wykazujące oznak zepsucia	1	0	1,3	5,5	10	0	0	laseczki	,,	,,	,,	,,	4,12	20,0	7,45	9,02
	1	0	0,64	4,7	10	10	0	laseczki	,,	,,	,,	,,	4,12	19,7	6,85	9,14
Not spoiled, but unsuitable for usage because of bad taste	1	0	2,3	55,0	0	30	0	laseczki	,,	,,	,,	,,	4,10	18,4	10,20	9,70
	1	0,08	0	nie policz.	przerośnięta	10	0	laseczki	,,	,,	,,	,,	4,05	17,7	7,20	8,88
	2	0	173—225	7,5—14,5	0—5	10—20	0	pałeczki i laseczki	,,	,,	,,	,,	4,15	22,0	10,80	8,1—8,7
Zepsuty, zapleśniały Spoiled, overgrown with moulds	1	0,9	3,4	200,0	1.900.000	42.000	0	pałeczki zakwaszające, laseczki, pleśnie	pałeczki pleśnie	—	pałeczki	—	4.90	7.0	8,15	0,0
	1	1,1	8,8	150,0	500.000	2.000	0	pleśnie, drożdże, laseczki	drożdże	—	—	—	4,25	17,0	10,7	4,08
Zapleśniały i kwaśny Overgrown with moulds and sour	1	0,03	8,5	244,0	30,000	3.500	0	pałeczki, laseczki drożdże	pałeczki drożdże	laseczki	laseczki	nieliczne laseczki	4.11	11,6	15.9	0,40
Sfermentowany, kwaśny Fermented, sour	1	0,023	0	575,0	1.200.000	350.000	0	pałeczki zakwaszające	pałeczki	laseczki	laseczki	laseczki	3,88	16.9	16,0	1,44
	1	0,03	1,7	150,0	1.000		20	pałeczki zakwaszające i laseczki	pałeczki	laseczki	laseczki	laseczki	3,70	18,4	18,9	2,34

* Jeden koncentrat wykazał wzrost laseczek na pożywce Wrzoska nieogrzewanej i ogrzewanej.

Pałeczki zakwaszające oznaczono wg klucza Bergeya (1957), zaliczając je do 2 rodzajów: *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Górecka (1958) zaliczyła drożdże do 3 rodzajów: *Candida, Saccharomyces* i *Torulopsis*.

Szczegółowe badania dotyczące bakterii mlekowych, drożdży i laseczek powodujących zepsucia produktów pomidorowych zostaną opublikowane w dalszych częściach niniejszej pracy.

WNIOSKI

Przeciery i koncentraty pomidorowe, pasteryzowane, badane metodą płytkową w większości przypadków były jałowe, a w próbkach niejałowych wykrywano przeważnie tylko laseczki typu *B. subtilis-mesentericus*. Koncentraty utrwalone środkami chemicznymi uznane za dobre wykazywały zakażenie nie większe od koncentratów pasteryzowanych, natomiast w koncentratach uznanych za zepsute znaleziono mikroskopowo i metodą płytkową duże ilości drobnoustrojów.

Wyizolowane bakterie zakwaszające, drożdże i pleśnie rosły dobrze na soku pomidorowym o *pH* 4,2, zmieniając jego *pH*. Na tej podstawie uznano je za drobnoustroje powodujące zepsucie produktów pomidorowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań mikrobiologicznych ustalono następujące granice dopuszczalnego zakażenia:

1. Dla koncentratów nadających się do spożycia i magazynowania: ogólna liczba drobnoustrojów, wykrywanych mikroskopowo nie może przekraczać w 1 g koncentratu: strzępków grzybni — 200.000; drożdży — 2.10^6; bakterii — 20.10^6. W metodzie płytkowej nie powinno być więcej niż 20 laseczek.

2. Dla koncentratów nadających się do spożycia, lecz nie nadających się do magazynowania: ogólna liczba drobnoustrojów oznaczonych mikroskopowo nie powinna przekraczać, na 1 g produktu: strzępków grzybni — 200.000—500.000, drożdży 2.10^6—10^7, bakterii 2.10^7—5.10^7. Liczba drobnoustrojów oznaczanych metodą płytkową nie może przewyższać w 1 g produktu: 10 pałeczek zakwaszających, 20 laseczek i 10 komórek drożdży.

3. Jako produkty nie nadające się do spożycia uznano koncentraty pomidorowe, wykazujące zakażenie przekraczające powyższe granice, względnie zawierające bakterie beztlenowe lub chorobotwórcze.

W żadnej z badanych próbek przecierów lub koncentratu pomidorowego nie wykryto *Bacillus thermoacidurans*.

pH koncentratów pomidorowych było niejednokrotnie niższe od 4,0, jednak w żadnym przypadku nie stwierdzono zepsucia płasko-kwaśnego.

W związku z tym należy przypuszczać, że tak niskie *pH* nie jest wynikiem zepsucia, tak jak sugeruje White, lecz zależy od natury naszych pomidorów, które są kwaśniejsze od pomidorów południowych.

Zespołowi współpracującemu: mgr H. Góreckiej, mgr A. Kędzierskiej mgr D. Tarasiuk, inż. H. Wróblewskiej i inż. K. Piaseckiej, który wniósł duży wkład pracy przy wykonywaniu analiz mikrobiologicznych i chemicznych, składam wyrazy podziękowania.

Czuję się również w miłym obowiązku wyrażenia wdzięczności prof. dr J. Jakubowskiej i doc. P. Wojcieszakowi za wniesione uwagi merytoryczne.

LITERATURA

Becker M. E., Pederson C. S., 1950: The physiological characters of *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*). *J. Bact.*, **59**: 717.

Breed R. S., Murray E. D. G., Smith N. R., 1957: Bergey's manual of determinative bacteriology, London, Baillière, Tindall, Cox Ltd.

Burbianka M., Pliszka A., 1957: Mikrobiologiczne badanie produktów żywnościowych. Warszawa, PZWL.

Camargo R., Phaff H., 1957: Yeast occuring in *Drosophila* flies and in fermenting tomato fruits in Northern California. *Food Res.*, **4**: 367.

Cciba L., 1954: Mikrobiologiczne zmiany i widoczne zepsucie produktów pomidorowych, bez wytwarzania gazu (tłumaczenie polskie) *Elelmezesi Ipar*, **5**: 147.

Górecka H., 1958: Charakterystyka drożdży występujących w koncentracie pomidorowym. Dokumentacja IPF.

Kosewska L., 1959: Opracowanie metody zapobiegania mikrobiologicznemu psuciu się koncentratu pomidorowego o zawartości 20% ekstraktu. *Prace Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, **3**: 1.

Kosewska L., 1960: Mikrobiologiczne wskaźniki jakości koncentratu pomidorowego. *Przem. Spoż. Biul. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, **2**: 48 (108).

Pederson C. S., 1929: The types of organisms found in spoiled tomato products. *New York St. Agr. Exp. Sta., Geneva,* N. Y. *Tech. Bull.* nr. 150.

Ragneb H. S., Fabian F. W., 1955: Growth and pectolytic activity of some tomato moulds at different *pH* levels. *Food Res.*, **20**: 614.

Rogaczewa, A. I., Kostrowa E. J., 1956: Mikrobiołogija tomato produktow. Moskwa.

Sewer-Lewandowska B., Borlicka B., 1958: Badania nad ustaleniem prawidłowej oceny organoleptycznej konserw z zielonego groszku, płynnego owocu i koncentratu pomidorowego. *Prace Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, **3**: 8.

Stern R. M., Hegarty C. P., Williams O. B., 1942: Detection of *B. thermoacidurans* (Berry) in tomato juice and succesful cultivation of the organism in the laboratory. *Food Res.*, **7**: 186.

Supińska-Jakubowska J., 1951: Samofermentacja miazgi pomidorowej. *Przem. Spoż.*, **2**: 69.

White L. S., 1951: Spoilage bacteria in tomato products. *Food Res.*, **16**: 422.

Lidia Kosewska

MICROBIOLOGY OF SOME TOMATO PULP AND TOMATO PASTE PRODUCED IN POLAND

Summary

Microbiological, chemical and organoleptic examinations of six samples of the pasteurised, one sample of the chemically preserved tomato pulp, 29 samples of the pasteurised paste with 20% of the extract and 86 samples of preserved chemically tomato paste, were done (see Tables I—III).

In samples of tomato products, shown to be sterile by the routine laboratory microbiological methods, many microbial cells could be found during microscopic investigation.

The degree of this initial infection had a great influence upon the quality of the ready product. In 1 g of tomato pulp and paste of high quality not more than 2.10^5 mould filaments, 2.10^6 yeast cells and 2.10^7 bacteria have been found.

The spoiled products contained more than 10^6 mould filaments, $2{,}25.10^6$ yeast cells, 575.10^8 bacteria per 1 g. In the majority of examined samples of pulp and paste no viable microorganisms were found. Few samples were infected with bacilli and rods. Spoiled products were infected chiefly with lactobacilli. Yeasts, moulds and bacilli were only ocasionally met with.

Lactobacilli, yeasts and moulds were able to grow in acidyfied tomato juice. It was then concluded that these microorganisms mey be looked upon as the chief cause of spoilage of tomato products. No cases of flat-sour spoilage due to *B. thermoacidurans* were observed.

Adres autorki:
Author's address:

Mgr Lidia Kosewska,
Instytut Przemysłu Fermentacyjnego
Warszawa, ul. Rakowiecka 8

KSIĄŻKI OTRZYMANE — BOOKS RECEIVED

Abstracts of Japanese Medicine, Vol. I, No 1, 1960. Wydawcy: T. Yoshida (Tokio) i J. Huizinga (Amsterdam), Wydawnictwo: Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 119—123 Herengracht, Holandia, stron 187, streszczeń — 488.

Nowe wydawnictwo Excerpta Medica referuje niemal wszystkie japońskie czasopisma medyczne. Wśród 12 działów, referowane też są prace z dziedzin teoretycznych, a między nimi z mikrobiologii, immunologii, serologii, biochemii, fizjologii.

Czasopismo, informując bieżąco czytelnika o fachowej literaturze japońskiej, publikowanej często w niedostępnych na ogół periodykach i w większości przypadków w języku japońskim, stanowi konieczne uzupełnienie każdej większej biblioteki medycznej i biologicznej.

Emil Bergander: *Biochemie und Technologie der Hefe*. Technische Fortschrittsberichte, tom 59. Wydawnictwo: Theodor Steinkopff, Drezno, Loschwitzer Strasse 32, 1959. stron 190, rysunków 15.

Ta mała, w poręcznym formacie i ładnie wydana książeczka przeznaczona jest dla techników i chemików pracujących w zakładach produkcji drożdży (piekarnianych, paszowych itd). Wstęp omawia w sposób dość pobieżny i uproszczony podstawowe wiadomości o drożdżach (budowy, cytologia, fizjologia, fermentacja alkoholowa). Pozostałe rozdziały poświęcone są treściwemu przedstawieniu podstaw technologii drożdżarskiej.

Tego rodzaju układ ogranicza możliwości korzystania z książki: dla technologów zawiera omawiany tomik za mało wiadomości czysto technologicznych, dla biologa — zbyt pobieżnie potraktowane są drożdże jako organizmy żywe. Książka może być jednak wskazana jako literatura początkowa zarówno dla chemików jak i biologów, zamierzających interesować się drożdżarstwem, oraz dla techników z średnim wykształceniem.

Wł. Kunicki-Goldfinger

SPIS TREŚCI — CONTENTS

1. Wł. Kunicki-Goldfinger: Bronisław Niklewski (1879—1967) jako mikrobiolog 123
2. Wł. Kunicki-Goldfinger: Adaptive enzymes in the pathway of tryptophane synthesis in *Escherichia coli*
Enzymy adaptacyjne w przebiegu syntezy tryptofanu u *Escherichia coli* 129
3. M. Hierowski i Z. Stolzmann: Wpływ chloramfenikolu na aktywację aminokwasów u *Escherichia coli K-12a*
Influence of chloramphenicol upon amino-acids activation in *Escherichia coli K-12a* 135
4. J. Horodko, B. Mikiewicz, K. Naimski, K. Zakrzewski: Wpływ jonów potasu i sodu na wytwarzanie toksyny błoniczej
The influence of potassium and sodium ions on diphteria toxin production 141
5. W. Drożański: The influence of bacteria on the excystment of soil amoebae
Wpływ bakterii na kiełkowanie cyst ameb glebowych 147
6. L. Jabłoński i S. Popławski: Badania nad kwasem dezoksyrybonukleinowym (DNA) pałeczek *Brucella*. Wstępne próby transformacji
Deoxyribonucleic acid in *Brucella*. Preliminary study of transformation 155
7. M. Decowski: Wytwarzanie hialuronidazy przez włoskowce różycy. II. Niektóre właściwości enzymu
Production of hyaluronidase by *Erysipelothrix rhusiopathiae*. II. Properties of the enzyme 161
8. E. Strzelczyk: Studies on the incidence of certain nutritional and physiological groups of bacteria in rhizosphere and nonrhizosphere soil
Badania nad występowaniem niektórych grup „pokarmowych" i fizjologicznych bakterii w rizosferze i w glebie poza korzeniami 169
9. S. Kołaczkowski, J. Kowalczyk, Z. Piotrowski i Z. Żukowski: Chlorowanie ścieków w sanatoriach przeciwgruźliczych. II. Skuteczność chlorowania ścieków
Desinfection of sewage of antituberculous sanatoria with chlorine. Part II 181
10. J. Jakubowska i H. Oberman: Wpływ *pH* i składników podłoża na przemianę gazową i tworzenie acetoiny przez *Streptococcus diacetilactis*
Influence of *pH* and of some medium constituents on the gaseous exchange and acetoin production by *Streptococcus diacetilactis* 187
11. H. Karczewska i H. Świeżyńska: *Torulopsis pinus var. albida* — nowa odmiana drożdży, wyizolowana z brunatnej strupowatości topoli *Torulopsis pinus var. albida* — a new yeast variety isolated from poplar brown crust 199
12. M. Brzozowska: Fizyko-chemiczne właściwości dekstranu syntetyzowanego przez szczepy *Leuconostoc* różnego pochodzenia
Physico-chemical properties of dextran produced by *Leuconostoc* strains of different origin 205
13. L. Kosewska: Mikroflora niektórych przecierów i koncentratów pomidorowych produkowanych w Polsce. I. 211
Microbiology of some tomato pulp and tomato paste produced in Poland
Książki nadesłane 221

Warunki prenumeraty kwartalnika

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

Cena w prenumeracie zł 100,— rocznie
zł 50,— półrocznie

Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Przedsiębiorstwo Upowszechniania Prasy i Książki „Ruch" Wrocław, ul. Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768
2. Urzędy pocztowe
3. Księgarnie „Domu Książki"

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100-024.

Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" oraz w Ośrodku Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych Polskiej Akademii Nauk — Wzorcownia Wydawnictw Naukowych PAN — Ossolineum — PWN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter).

Tylko prenumerata zapewnia regularne otrzymywanie czasopisma

Cena zł 25,—

Wydawane z zasiłku
POLSKIEJ AKADEMII NAUK